

**DIREKTE ZELLROSETTIERUNG
MIT HILFE MONOKLONALER ANTIKÖRPER :
EINE WIRKUNGSVOLLE METHODE FÜR DEN
EMPFINDLICHEN NACHWEIS VON MEMBRANANTIGENEN
UND FÜR DIE PRÄPARATIVE AUFTRENNUNG
GROSSER ZELLMENGEN**

HEINRICH PECHUMER

1985

*Gess
München*

AUS DEM INSTITUT FÜR IMMUNOLOGIE DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

DIREKTOR: PROF. DR. G. RIETHMÜLLER

DIREKTE ZELLROSETTIERUNG MIT HILFE MONOKLONALER ANTIKÖRPER:
EINE WIRKUNGSVOLLE METHODE FÜR DEN EMPFINDLICHEN NACHWEIS
VON MEMBRANANTIGENEN UND FÜR DIE PRÄPARATIVE AUFTRENNUNG
GROSSER ZELLMENGEN

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE IN DER GESAMTEN MEDIZIN
AN DER LUDWIG MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

VORGELEGT VON
HEINRICH PECHUMER

AUS
MILTENBERG

1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter : Prof. Dr. E.P. Rieber

Mitberichterstatter : Prof. Dr. G. Riethmüller

Dekan : Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung : 5. 12. 1985

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. MATERIALIEN UND METHODEN	3
2.1 Präparation von peripheren Blut Lymphozyten (PBL)	3
2.2 Präparation von nicht-adhärenenten Lymphozyten (NAL) und adhärenenten Monozyten	3
2.3 Monoklonale Antikörper (MAK)	3
2.4 Konjugation von MAK auf die Oberfläche von Rinder-Erythrozyten (E)	4
2.5 Herstellung von AET-SE	4
2.6 Reinigung von T-Zellen durch direkte Rosettierung	5
2.7 Reinigung von Monozyten (MØ) durch direkte Rosettierung	6
2.8 Nachweis des T-Zell-Antigens T4 auf MØ und Zelllinien durch direkte Rosettierung	6
2.9 Auftrennung von MØ in T4-positive und T4-negative Populationen	7
2.10 Proliferationstests	8
2.10.1 Stimulation mit PHA und löslichem Antigen	8
2.10.2 Allogene MLR (gemischte Lymphozyten-Kultur)	8
2.11 Elimination von T-Zellen und T-Zell-Subpopulationen	9
2.12 Zellkultur zur Ig-Synthese in vitro	9
2.13 Nachweis sezernierter AK im Überstand mit der ELISA-Technik (Enzyme linked Immunosorbent Assay)	10
2.14 Stabilitätsvergleich direkter und indirekter Rosetten	11
2.14.1 Indirekte Rosettierungsmethode	11
2.14.2 Vergleich der Stabilität direkter und indirekter Rosetten	11

	Seite
2.15	Komplementlyse 11
2.16	Elimination von T-Zellen aus Knochenmark (KM) 12
2.17	Indirekte Immunfluoreszenz (IF) 12
2.18	Zytozentrifugenpräparate 13
2.19	Pappenheimfärbung 13
2.20	FACS-Analyse 13
2.21	CFU-c 14
3.	ERGEBNISSE 15
3.1	Nachweis des T4-Antigens auf MØ durch direkte Rosettierung 15
3.2	Isolierung von Monozyten durch direkte Rosettierung mit Hilfe von MAK M 42 19
3.3	Spezifischer Nachweis des schwach exprimierten T-Zell-Antigens T4 auf Monozyten (MØ) durch direkte Rosettierung 23
3.4	Isolierung von T-Zellen durch direkte Rosettierung 30
3.5	Auftrennung von MØ in T4-positive und T4-negative MØ durch direkte Rosettierung 31
3.6	Stimulation von T-Zellen durch PHA in Gegenwart T4-positiver und T4-negativer MØ 32
3.7	Stimulation von T-Zellen durch lösliches Antigen in Gegenwart T4-positiver und T4-negativer MØ 34
3.8	Stimulation von T-Zellen durch allogene T4-positive und T4-negative MØ 34
3.9	Bildung Antigen-spezifischer Antikörper in vitro und Regulation der spezifischen Sekretion durch verschiedene T-Zell-Populationen nach Reinigung von B-Zellen und T-Zell-Subsets durch direkte Rosettierung 37

3.10	Anwendung der direkten Rosettierungs- technik mit MAK bei Knochenmarktrans- plantationen	42
3.10.1	Vergleich der direkten Rosettierung mit der Komplement-Lyse	43
3.10.1.1	Elimination von T-Zellen	43
3.10.1.2	Elimination von leukämischen Zellen	44
3.10.2	Vergleich der direkten Rosettierungs- technik mit anderen Rosettierungsmetho- den hinsichtlich der Rosettensta- bilität	46
3.10.2.1	Vergleich Direkte Rosettierung - Indirekte Rosettierung	46
3.10.2.2	Vergleich Direkte Rosettierung - Spontanrosettierung mit Schafs- erythrozyten	48
3.10.3	Untersuchungen zur Differentiations- fähigkeit von Stammzellen in KM nach einer direkten Rosettierung	48
3.10.4	Anwendung der direkten Rosettierungs- methode mit MAK T 910 bei der Entfer- nung von T-Zellen aus allogenen KM	51
4.	DISKUSSION	53
5.	ZUSAMMENFASSUNG	67
6.	LITERATURVERZEICHNIS	69

ABKÜRZUNGEN

AET	Aminoäthylisothiuroniumbromid
AK	Antikörper
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
class I	HLA-A, B, C
class II	HLA-Dr, DQ, DP
cpm	"counts per minute"
E	Rinder-Erythrozyten
EBV	Epstein Barr Virus
ELISA	Enzymgekoppelter Immunsorbenttest
FCS	fötales Kälber-Serum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GvH	Graft-versus-host
IF	indirekte Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarktransplantation
MAK	monoklonaler Antikörper
MLR	gemischte Lymphozyten Kultur
MØ	Makrophagen/Monozyten
NAL	nicht adhärente Lymphozyten
PBL	periphere Blut-Leukozyten
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PHA	Phytohämagglutinin
PPD	Purified protein derivative (Tuberkulin)
SE	Schäfererythrozyten
TT	Tetanus-Toxoid

1. EINLEITUNG

Monoklonale Antikörper (MAK), die im Gegensatz zu polyklonalen Antiseren nur eine einzige antigene Determinante erkennen, haben die Charakterisierung tierischer und menschlicher Leukozytenantigene in den letzten Jahren revolutioniert (18, 23, 51, 57, 76, 84, 85, 86, 94, 114). Ein breites Anwendungsgebiet für MAK ist die indirekte Immunfluoreszenz (IF) zum Nachweis von Membranantigenen. Mit Hilfe automatisierter Zytofluorographen können Antigendichten auf Zelloberflächen quantitativ bestimmt werden. In Verbindung mit einer Sortiervorrichtung können Zellpopulationen, die in der IF markiert wurden, auch aufgetrennt werden (Fluorescence-Activated-Cell-Sorter, FACS).

Nachteile der FACS-Trennung sind die begrenzte Anzahl von Zellen, die in einem angemessenen Zeitraum aufgetrennt werden können (ca. 10^7 Zellen/h), die Aufwendigkeit und Störanfälligkeit der Apparatur und die oft auftretenden bakteriellen Kontaminationen.

Andere Möglichkeiten, Oberflächenantigene nachzuweisen, sind indirekte Rosettierungsverfahren (46, 49, 124) mit Kunststoffperlen oder Erythrozyten, deren Oberflächen mit einem Antiserum beschichtet sind, das mit den verwendeten MAK reagiert. Bei indirekten Rosettierungen werden die Zellen zunächst mit dem MAK inkubiert, dann mehrmals gewaschen und schließlich mit den Antiserum-beschichteten Erythrozyten rosettiert. Die rosettierten Zellen können mit dem Mikroskop ausgezählt werden. Indirekte Rosettierungsverfahren mit Erythrozyten in Verbindung mit einer Gradienten-Zentrifugation können auch für die Auftrennung von Zellpopulationen verwendet werden (1, 21, 45).

Ein direktes Verfahren zur Auftrennung von Zellen ist eine Methode, die als "Panning" bezeichnet wird (32, 33,

125). Bei dieser Methode werden MAK an Kunststoffoberflächen adsorbiert. Zellen, die das entsprechende Oberflächenantigen tragen, werden von dem adsorbierten MAK zurückgehalten. Der Reinheitsgrad der so aufgetrennten Zellpopulationen ist jedoch nach eigenen Beobachtungen meist nicht befriedigend.

Direkte Rosettierungsverfahren, bei denen MAK direkt auf die Partikeloberfläche konjugiert werden, wurden neben indirekten Rosettierungstechniken für den Nachweis von Oberflächenantigenen bereits eingesetzt (59). In der hier vorgelegten Arbeit wurde eine direkte Rosettierungsmethode mit MAK für den Nachweis schwach exprimierter Oberflächenantigene und für die Auftrennung großer Zellmengen optimiert. Das Verfahren ist ähnlich der Rosettierung mit Schafserythrozyten (SE), die spontan menschliche T-Zellen binden. Durch die Bindung von MAK auf Rinder-Erythrozyten, die im Gegensatz zu SE mit menschlichen Leukozyten keine "spontanen" Rosetten bilden, läßt sich die direkte Rosettierungstechnik für den Nachweis beliebiger Antigene, für die MAK existieren, einsetzen. Die Auftrennung großer Zellmengen ist mit dieser Methode im Vergleich mit der indirekten Rosettierungstechnik wesentlich schneller und einfacher durchzuführen. Im Vergleich mit dem FACS scheint die direkte Rosettierungstechnik im Nachweis schwach exprimierter Antigene aufgrund der hier vorgestellten Versuche empfindlicher zu sein. Wegen ihrer hohen Nachweisempfindlichkeit, ihrer einfachen Durchführbarkeit und der guten Depletionsergebnisse wurde die direkte Rosettierungsmethode auch bei Knochenmarkstransplantationen eingesetzt. Mit dieser Methode können für die Transplantation unerwünschte Zellen, gegen die MAK existieren, aus sehr großen Mengen von Knochenmarkszellen quantitativ eliminiert werden.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Präparation von peripheren Blut Lymphozyten (PBL)

PBL wurden aus heparinisiertem Blut (1:1 verdünnt mit PBS, pH 7,4) gesunder, freiwilliger Spender durch Zentrifugation (30 min 400 g) über einen Ficoll-Paque Dichte-Gradienten (Pharmacia, Nr. 17-0840-03, Dichte 1,077 g/ml) gewonnen. Die Zellen wurden gewaschen und in Kulturmedium (s. 2.12) aufgenommen. Die Vitalität der Zellen lag bei 99 % (Trypanblau-Ausschluß).

2.2 Präparation von nicht-adhärenenten Lymphozyten (NAL) und adhärenenten Monozyten

PBL wurden für zwei Stunden in Kulturmedium auf sterilen Petrischalen im Brutschrank aufbewahrt. Nicht-adhärenente Zellen wurden durch mehrmaliges Spülen mit RPMI 1640 (Gibco, Nr. 041-1870) gewonnen.

Adhärrierende Monozyten wurden eine Stunde in PBS bei 4°C aufbewahrt, durch heftiges Spülen mit PBS abgelöst und in kaltem Kulturmedium aufbewahrt.

2.3 Monoklonale Antikörper (MAK)

Alle für direkte Rosettierungen verwendeten murine MAK wurden im Labor Prof. Dr. Rieber hergestellt.

MAK M 42 (IgM): erkennt alle peripheren Monozyten

MAK T 151 (IgG 2a): anti-T4 (CD 4)

MAK T 310 (IgG 1) : anti-T4 (CD 4)

MAK T 811 (IgG 1) : anti-T8 (CD 8)

MAK T 910 (IgG 1) : anti-E-Rezeptor (CD 2)

MAK 29 (IgG 1) : ohne Zielantigen auf PBL

An Rinder-Erythrozyten (E) direkt konjugierte MAK werden in dieser Arbeit als MAK-E bezeichnet, z.B. 42-E, 811-E, 151-E, 910-E usw.

Offizielle Bezeichnung der hier verwendeten MAK: MM 42, MT 151, MT 310, MT 811, MT 910. Diese MAK sind z.T. in zwei internationalen Workshops klassifiziert worden (s. CD-Nomenklatur).

Von MAK T 151 wurden auch $F(ab')_2$ -Fragmente eingesetzt, die in der PAG-Elektrophorese zu mehr als 95 % rein waren.

2.4 Konjugation von MAK auf die Oberfläche von Rinder-Erythrozyten (E)

Mehrere Milliliter eines Sedimentes von Rinder-Erythrozyten (E) wurden 5mal mit 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen. Die Konjugation erfolgte bei 30°C über eine Stunde:

1,5 ml NaCl-Lösung

1 ml E-Sediment

1 mg MAK in NaCl-Lösung (Vol. 100-200 μ l)

100 μ l $CrCl_3$ -Lösung (16,5 mg $CrCl_3$ in 10 ml NaCl)

Nach einer Stunde wurden die konjugierten MAK 5mal in NaCl-Lösung gewaschen und in FCS mit 1 % Penicillin/Streptomycin aufbewahrt. Die Haltbarkeit dieser Suspension lag bei ca. zwei Monaten. Der Konjugationsschritt muß ohne Spuren von Phosphat durchgeführt werden.

2.5 Herstellung von AET-SE

Viermal mit PBS gewaschene Schaf-Erythrozyten (SE) wurden 1:5 mit einer AET-Lösung (1 g Aminoäthylisothiuroniumbromid in 25 ml H_2O bidest, pH 9) gemischt und 15 min bei 37°C inkubiert.

Dann wurde 5mal mit PBS gewaschen und die AET-SE wurden in mit SE absorbiertem FCS aufgenommen.

2.6 Reinigung von T-Zellen durch direkte Rosettierung

1×10^8 PBL wurden in einem konischen Röhrchen (Falcon, Nr. 2070F) mit einem 30fachen Überschuß an 910-E (gelegentlich auch mit AET-SE nach 15 min Inkubation bei 37°C) in einem Volumen von 10 ml RPMI 1640/10 % FCS gemischt und 5 min bei 100 g und 4°C zentrifugiert. Die Zellen wurden eine Stunde auf Eis aufbewahrt, dann wurde das Sediment in 20 ml kaltem RPMI 1640 resuspendiert und in zwei konische Röhrchen mit je 15 ml eines Percoll-Gradienten (Pharmacia 17-0891-01) (Dichte 1,082 g/ml) überschichtet. Anschließend wurde für 20 min bei 700 g zentrifugiert (Raumtemperatur). Nach Entfernung der Interphasen wurden die Sedimente gewaschen und zur Lyse der Erythrozyten eine Minute mit 0,83 % NH_4Cl -Lyse-Puffer gemischt. Die Sedimente wurden verreinigt, zweimal gewaschen und in Kulturmedium aufgenommen.

Die Reinheit der T-Zellen wurde durch Immunfluoreszenz (IF) mit verschiedenen käuflichen pan-T-AK überprüft und lag immer bei 98 %. Gerinigte T-Zellen wurden durch Rosettierung mit 42-E auf kontaminierende Monozyten (MØ) untersucht. Die MØ-Kontamination lag bei ≤ 1 % (% Rosetten nach Anfärbung der Zellen mit Kristallviolett).

In manchen Fällen wurde der Anteil kontaminierender MØ durch Rosettierung mit 42-E und Zentrifugation über Ficoll (Dichte 1,077, 20 min, 700 g) unter 1 % gesenkt (T42⁻).

2.7 Reinigung von Monozyten (MØ) durch direkte Rosettierung

1×10^8 PBL wurden auf vier konische Röhrchen (Falcon, Nr. 2070F) verteilt und in einem Volumen von ca. 5 ml RPMI 1640/10 % FCS mit einem ca. 50fachen Überschuß von 42-E (MAK M 42 erkennt MØ) durch kurze Zentrifugation (5 min, 4°C, 100 g) sedimentiert. Die Mischung wurde eine Stunde auf Eis aufbewahrt, dann vorsichtig mit je 10 ml kaltem RPMI 1640 resuspendiert und in vier konischen Röhrchen auf je 15 ml eines Percoll-Gradienten (Dichte 1,082-1085 g/ml) geschichtet. Nach Zentrifugation für 20 min bei 700 g wurden die Interphasen verworfen und die Sedimente gewaschen. Die Sedimente wurden mit Hilfe eines 0,83 % NH_4Cl -Lyse-Puffers von Erythrozyten befreit, dann vereinigt, zweimal gewaschen und in kaltem Kulturmedium aufgenommen.

Vor der Lyse enthielt das Sediment bei Zentrifugation über Percoll der Dichte 1,082 $\geq$ 90 % Rosetten, bei Zentrifugation über Percoll der Dichte 1,085 99 % Rosetten.

Die nach Pappenheim gefärbten Zytozentrifugenpräparate der gereinigten MØ zeigten die hohe Reinheit der MØ-Population.

2.8 Nachweis des T-Zell-Antigens T4 auf MØ und Zelllinien durch direkte Rosettierung

Gereinigte MØ oder Zellen von Zelllinien wurden mit einem Überschuß von anti-T4 konjugierten Erythrozyten (310-E, 151-E, 151-F(ab')₂-E) oder mit Erythrozyten, die mit Kontrollantikörpern konjugiert waren (811-E, 29-E)

für drei Stunden auf Eis in RPMI 1640/20-30 % FCS nach kurzer Zentrifugation (5 min, 100 g) in Falcon-Röhrchen (Nr. 2095) rosettiert. Das Sediment wurde vorsichtig resuspendiert und der Anteil rosettierter Zellen wurde nach Färbung der Zellen mit Kristallviolett mikroskopisch ausgezählt (Tab. 2).

Als Zelllinien wurden verwendet (erhalten von Dr. Ziegler, Institut für Immunologie, München):

U 937

K 562

B-Zell-Linie (EBV-transformiert, Dr. J. Johnson,
München)

Jurkat

2.9 Auftrennung von MØ in T4-positive und T4-negative Populationen

Gereinigte MØ wurden mit einem 100fachen Überschuß an anti-T4-E in RPMI/20 % FCS für drei Stunden auf Eis nach kurzer Zentrifugation (5 min, 100 g) rosettiert. Dann wurde die Mischung vorsichtig resuspendiert (RPMI 1640) und über Ficoll zentrifugiert (20 min, 700 g). Die Interphase, die weitgehend von T4-positiven Zellen depletiert war (bezeichnet als MØ 310⁻, MØ 151⁻), wurde gewaschen und in kaltem Kulturmedium aufgenommen. Bei erneuter Rosettierung von Aliquoten der T4-negativen Population mit anti-T4-E bildeten sich noch ca. 5 bis 10 % schwache Rosetten (< 4 Erythrozyten/Rosette).

In einigen Fällen wurde das Sediment lysiert und die verbleibenden MØ wurden als T4-positive MØ bezeichnet (MØ 310⁺, MØ 151⁺). Die angereicherte T4-positive Population enthielt vor der Lyse ca. 80 bis 90 % Rosetten und unterschied sich in dieser Hinsicht nicht immer deutlich von den meisten ungetrennten MØ-Populationen (ca. 80 %

Rosetten). Die T4-positiven MØ hatten einen zusätzlichen Lyseschritt durchgemacht. In einigen Versuchen wurden statt der T4-angereicherten MØ ungetrennte (MØ 42⁺) MØ im Vergleich mit T4-negativen eingesetzt.

2.10 Proliferationstests

2.10.1 Stimulation mit PHA und löslichem Antigen

1×10^5 PBL oder 5×10^4 gereinigte T-Zellen wurden mit verschiedenen MØ-Populationen (ungetrennte, T4-negative und -positive) in Rundboden-Microtiterplatten (Costar, Nr. 3799) in 200 µl Kulturmedium (RPMI 1640 mit 10 % FCS, 1 % Penicillin-Streptomycin, 2 mM Glutamin, 5×10^{-5} M Mercaptoäthanol) bei 5 % CO₂ in einem Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden mit PHA (1 %) oder Tetanus-Toxoid (5 µg/ml, TT, Geschenk der Behringwerke, Marburg) oder PPD (5 µg/ml) stimuliert. PHA-stimulierte Kulturen wurden nach 2 1/2 Tagen, TT- oder PPD-stimulierte Kulturen wurden nach 5 Tagen für 20 Stunden mit 1 µCi/Loch ³H-Thymidin (³H-TdR) inkubiert (78 µCi/mMol, NEN, Dreieich). Die Zellen wurden dann mit einem automatischen Zell-Harvester (Skatron, Norwegen) geerntet und die eingebaute Radioaktivität mit einem Liquid-Scintillation-Counter (Isocap 300, Searle, Nuclear Chicago, Zinsser Analytic Inc., Heidelberg) gemessen.

2.10.2 Allogene MLR

In der allogenen MLR wurden T42⁻-Zellen mit allogenen MØ 42⁺/MØ T4⁻ oder mit autologen, adhärenenten MØ für fünf Tage in RPMI/10 % AB-Serum stimuliert. Dann wurde wie oben (2.10.1) beschrieben mit ³H-TdR inkubiert und die eingebaute Radioaktivität gemessen.

2.11 Elimination von T-Zellen und T-Zell-Subpopulationen

Für die Präparation von B-Zellen (B + Null + MØ) wurden PBL mit 910-E für 1 Stunde auf Eis rosettiert und anschließend über Ficoll zentrifugiert (20 min, 700 g). Für die Präparation von T-Helfer-Populationen durch negative Selektion wurden gereinigte T-Zellen (s. 2.6) mit anti-T8 (MAK T 811)-E für eine Stunde auf Eis rosettiert. Die in kaltem Medium resuspendierten Zellen wurden über Ficoll (20 min, 700 g, Raumtemperatur) zentrifugiert. Die Interphase enthielt die depletierten Populationen [B-Population, die auch Null-Zellen und MØ enthielt oder T4-positive Population (T 811⁻)], die $\leq 1\%$ mit der jeweils rosettierenden Zellpopulation kontaminiert waren (bestimmt durch Rerosettierung, IF und durch Rosettierung mit Kaninchen-anti-Maus-IgG-E). Die Zellen wurden zweimal gewaschen und in Kulturmedium aufgenommen.

2.12 Zellkultur zur Ig-Synthese in vitro

B-Zellen (mit verschiedenen Mengen von T-Zellen oder T-Zell-Subpopulationen) wurden in 300 bis 350 µl eines angereicherten Kulturmediums (RPMI 1640 + 10 % FCS + 25 mM HEPES + 1 % Penicillin-Streptomycin + 2 mM L-Glutamin + 5×10^{-5} Mercaptoäthanol) in Flachboden-Microtiterplatten (Nunc, Nr. 1-67008) für 8 bis 10 Tage im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂, gesättigte Wasserdampfatmosphäre) inkubiert. Die ersten drei Tage wurden die Kulturen z.T. mit Tetanus Toxoid (TT, 10 ng/ml, Behring-Werke, Marburg) stimuliert. Am dritten Tage wurde das Medium weitgehend abgesaugt und erneuert. Am 8. bis 10. Tage wurden in den Überständen im ELISA AK gegen TT und Gesamt-IgG und -IgM bestimmt. Reste von TT (wenige ng/ml) in den Überständen beeinträchtigten den TT-ELISA nicht.

2.13 Nachweis sezernierter AK im Überstand mit der ELISA- Technik (Enzyme linked Immunosorbent Assay)

Rundboden-Microtiterplatten (Nunc, Nr. 4-49824, Wiesbaden) wurden über Nacht bei 4°C mit 3 µg/ml TT oder mit 50 µg/ml eines durch Affinitätschromatographie gereinigtes Ziege-anti-Mensch-IgG oder IgM (Labor Prof. Rieber) in PBS beschichtet. Am nächsten Tage wurden die Platten 3mal mit PBS/0,05 % Tween 20 (Fluka, Buchs/Schweiz) gewaschen. Die Absättigung noch freier Bindungsstellen erfolgte durch eine einstündige Zugabe von Rinderserum oder FCS (10 % in PBS/Tween 20). Nach einmaligem Waschen wurden 100 µl/Loch der Überstände bzw. einer Standardverdünnungsreihe aufgetragen (Tetanus-Standard: Tetanobulin, Immuno-IgG/M-Standard: Human IgG, Human IgM, Miles Lab., Ill.).

Nach einer Stunde wurden die Platten 3mal in PBS/Tween gewaschen und ein 1/3000 verdünntes Ziege-anti-Mensch-IgG bzw. IgM-Immunglobulin (F(ab')₂-Fragmente), das mit Peroxydase konjugiert war (Medac, Hamburg, Nr. 90-09-04), zugegeben. Nach einer Stunde unter Lichtabschluß wurde 4- bis 8mal gewaschen und schließlich das Substrat Orthophenylendiamin (10 mg auf 10 ml 0,1 M Citratpuffer + 1 µl H₂O₂) aufgetragen (100 µl/Loch).

Die Lichtabsorption des entstandenen gelben Farbstoffes wurde mit Hilfe eines automatischen Photometers (Titertek Multiskan, Flow, Meckenheim) bei 450 nm gemessen.

Die Nachweisgrenze für anti-TT-AK lag bei 1 bis 4 ng/ml, Für Gesamt-IgM bei 5 bis 10 ng/ml und für IgG bei 20 ng/ml.

Spezifitätskontrolle:

Die Spezifität der Messungen im TT-ELISA wurde durch die Zugabe steigender Mengen von TT oder DT zu einer 1:500-Verdünnung einer anti-TT-Standardverdünnung überprüft (nicht gezeigt, D.T.: Diphtherie-Toxoid, Geschenk der Behringwerke, Marburg).

2.14 Stabilitätsvergleich direkter und indirekter Rosetten

2.14.1 Indirekte Rosettierungsmethode

Im Unterschied zur direkten Methode wurden die Zellen zuerst bei 4°C für 30 min mit dem MAK inkubiert (50 µg/ml), dann zweimal mit kaltem RPMI gewaschen und schließlich mit Kaninchen-anti-Maus-IgG konjugierten Erythrozyten (5 min, 100 g) sedimentiert und für 2 Stunden auf Eis aufbewahrt.

2.14.2 Vergleich der Stabilität direkter und indirekter Rosetten

Direkt oder indirekt rosettierte Zellen wurden unter einer Belastung von 1 kp durch eine enge Kanüle (Ø 0,7 mm) gepreßt. Der verbliebene Rosettenanteil wurde nach jedem Durchgang nach Anfärben der Lymphozyten mit Kristallviolett im Mikroskop ausgezählt.

2.15 Komplementlyse

Die Komplement-Lyse wurde nach dem von Ritz et al. (95) beschriebenen Verfahren durchgeführt. PBL wurden mit dem gewählten MAK (50 µg/ml, 15 min) auf Eis inkubiert, dann zweimal gewaschen und 30 min Kaninchen-Komplement (1:5, Geschenk von Dr. Wank, Institut für Immunologie, München) bei 37°C im Brutschrank aufgewahrt. Nach erneutem Waschen wurde das Vorgehen noch zweimal wiederholt.

Die Reinheit der Zellen wurde durch IF und z.T. durch Rosettierung mit Kaninchen-anti-Maus-IG-E überprüft.

2.16 Elimination von T-Zellen aus Knochenmark (KM)

2×10^{10} KM-Zellen (gewonnen aus Zell-Separator) wurden durch Zentrifugation (15 min, 400 g) über Ficoll (Dichte 1,077 g/ml, Pharmacia) in 10 konischen Röhrchen (Nunc, Falcon Nr. 2070F) von autologen Erythrozyten weitgehend befreit. Nach einmaligem Waschen (RPMI 1640) wurden die restlichen 8×10^9 Zellen durch kurze Zentrifugation (5 min, 100 g) in 60 konischen Röhrchen mit einem 30fachen Überschuß an 910-E in je 10 ml RPMI 1640/5 % AB-Serum (25 mM HEPES, 1 % Penicillin-Streptomycin) auf Eis für zwei Stunden rosettiert. Anschließend wurden die Zellen eines jeden konischen Röhrchens in insgesamt 20 ml kaltem RPMI 1640 vorsichtig resuspendiert und je 10 ml der Suspension wurden auf 120 konische Röhrchen verteilt. Die Zellsuspension in jedem Röhrchen wurde dann mit je 15 ml Ficoll (Dichte 1,077 g/ml) unterschichtet. Die Röhrchen wurden sodann für 20 min bei 700 g (Raumtemperatur) zentrifugiert. Die Interphasen wurden gesammelt (4×10^9 Zellen), dreimal gewaschen (RPMI 1640) und schließlich in 100 ml RPMI aufgenommen, die dem Patienten infundiert wurden. Aliquote wurden auf Sterilität und durch Rerosettierung mit 910-E und durch IF mit verschiedenen pan-T-AK auf kontaminierende T-Zellen überprüft.

2.17 Indirekte Immunfluoreszenz (IF)

Die Reinheit aufgetrennter Zellpopulationen wurde oft mit Hilfe der Immunfluoreszenz überprüft.

$2,5 \times 10^5$ Zellen wurden bei 4°C mit 30 µl eines MAK (ca.

20 µg/ml) in U-Boden-Microtiterplatten (Nr. 651101, Greiner, Nürtingen) für 30 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen (RPMI 1640/10 % FCS) wurde als zweiter AK ein F(ab')₂-Antiserum (Kaninchen-anti-Maus-IgG-FITC und -IgM-Rhodamin, Lab. Prof. Rieber) für 30 min bei 4°C aufgetragen. Nach dreimaligem Waschen (RPMI 1640/10 % FCS) wurden die Zellen in FCS aufgenommen und im Fluoreszenz-Mikroskop (Leitz) ausgezählt.

2.18 Zytozentrifugenpräparate

10 bis 30 µl einer konzentrierten Zell(Rosetten-)-Suspension wurden in 200 µl PBS aufgenommen und mit Hilfe einer Zytozentrifuge (Cytospin, Shandon/Elliott, Feucht/Nürnberg) auf Objektträgern fixiert. Die Präparate wurden luftgetrocknet und anschließend nach Pappenheim gefärbt.

2.19 Pappenheimfärbung

Die luftgetrockneten Präparate wurden 5 min mit einer May-Grünwald-Lösung gefärbt, anschließend kurz mit Wasser gespült und dann für 15 min mit einer gepufferten Giemsa-Lösung gefärbt. Die Präparate wurden kurz in Wasser gespült und nach Trocknen im Mikroskop untersucht.

2.20 FACS-Analyse

Die Analyse indirekt markierter Zellen mit dem FACS wurde freundlicherweise von Herrn Elwart, Institut für Hämatologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung in München durchgeführt. Analysiert wurden jeweils 10 000 Zellen.

2.21 CFU-c

Die Bestimmung der CFU-c (Cluster/Colony-Forming-Units in culture) wurde freundlicherweise von Frau Christiansen in der Abteilung von Prof. Dr. Haas der Universitätskinderklinik München durchgeführt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Nachweis des Antigens T4 auf MØ durch direkte Rosettierung

Die hohe Nachweisempfindlichkeit der direkten Rosettierung mit monoklonalen Antikörpern (MAK) war schon in früher durchgeführten Versuchen aufgefallen. So ließ sich z.B. durch eine direkte Rosettierung mit dem MAK M 522, der ein myelo-monozytäres Antigen erkennt, eine T-Zell-Subpopulation deutlich markieren und auftrennen, die mit dem gleichen MAK in der indirekten Immunfluoreszenz (IF) nur ein sehr schwaches Fluoreszenzsignal ergab (94). Es konnte gezeigt werden, daß in dieser Population die T-Zell-assozierte NK-Aktivität enthalten war. Des weiteren fand sich bei direkten Rosettierungen von PBL mit dem MAK T 151, der das T-Zell-Antigen T4 erkennt, daß neben T-Zellen auch Monozyten (MØ) Rosetten bildeten. Abb. 1 zeigt als Beispiel neben T-Zell-Rosetten auch einige rosettierte Monozyten in einem nach Pappenheim gefärbten Zytozentrifugenpräparat.

Es ergab sich nun die Frage, ob die direkte Rosettierung in der Tat eine wesentlich empfindlichere Nachweismethode als die indirekte Immunfluoreszenz darstellte oder ob es sich nur um eine unspezifische Adsorption von Immunglobulin-beschichteten Erythrozyten an die Monozyten-Oberfläche handelte.

In den Experimenten, die im folgenden dargestellt sind, sollte diese Frage untersucht werden. Als erstes wurde eine quantitative zytofluorographische Analyse mit Hilfe des "Fluorescence activated cell sorter" (FACS) durchgeführt. Hierfür wurden PBL mit MAK T 151 in hohen Konzentrationen (50 µg/ml und 1 mg/ml) inkubiert und dann mit einem FITC-markierten anti-Maus-Ig-Antikörper gefärbt.

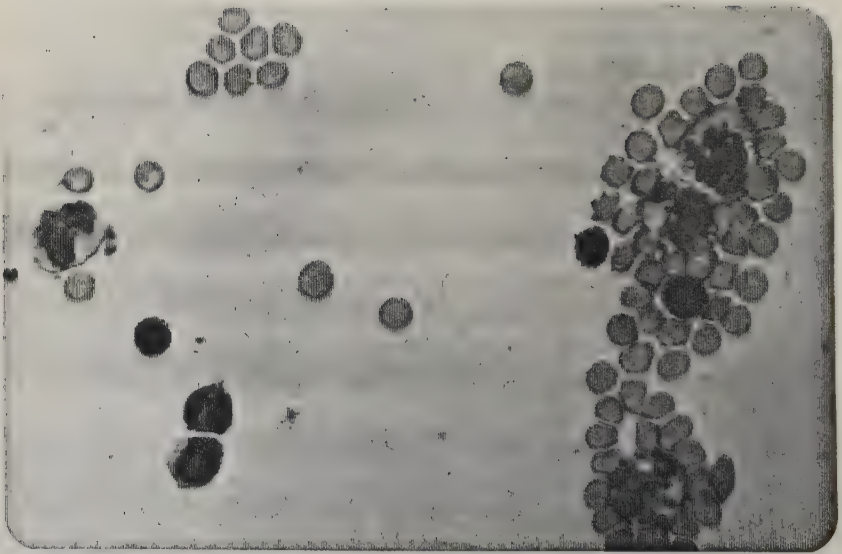


Abb. 1: Zytozentrifugenpräparat von PBL nach Rosettierung
mit MAK T 151-beschichteten Rindererythrozyten
x 1000, Färbung nach Pappenheim

Abb. 2 zeigt deutlich die Markierung von Lymphozyten in der FACS-Analyse, während im Bereich der MØ bei beiden MAK T 151-Konzentrationen keine Anfärbung zu erkennen ist. Der Kontrollantikörper MAK 29 zeigt keine Färbung menschlicher PBL in der FACS-Analyse.

Da der Nachweis des Antigens T4 auf MØ in der FACS-Analyse im Gegensatz zur direkten Rosettierung nicht gelang, war eine andere Kontrolle der Antispezifität der T4-Rosetten mit MØ notwendig. Bei der Rosettierung von PBL mit anti-T4-AK überwiegen die T-Zell-Rosetten in der Zahl, wobei eine klare morphologische Trennung rosettierter Lymphozyten und Monozyten nicht möglich ist. Andererseits werden Rosetten bei der Anfertigung von Zytozentrifugenpräparaten für die Färbung nach Pappenheim leicht zerstört. Aus diesen Gründen mußten MØ für die weiteren Untersuchungen in reiner Form gewonnen werden.

Für den Nachweis der Antigen-Spezifität der T4-Rosetten wurden folgende Kontrollversuche durchgeführt:

- 1) Um eine Bindung der MAK-beschichteten Erythrozyten über Fc-Rezeptoren auszuschließen, wurden einerseits zwei anti-T4-AK unterschiedlichen Isotyps sowie $F(ab')_2$ -Fragmente des einen anti-T4-AK verwendet, andererseits wurden direkte Rosettierungen mit MAK desselben Isotyps, jedoch anderer Spezifität durchgeführt.
- 2) Um auszuschließen, daß ein monoklonaler anti-T4-Antikörper auf MØ zufällig mit einer Struktur reagiert, die dem auf dem T4-Molekül erkannten Epitop sehr ähnlich ist (sog. "epitope sharing"), wurden zwei anti-T4-AK eingesetzt, die an unterschiedliche Epitope auf dem T4-Molekül binden (MAK T 151 und MAK T 310).

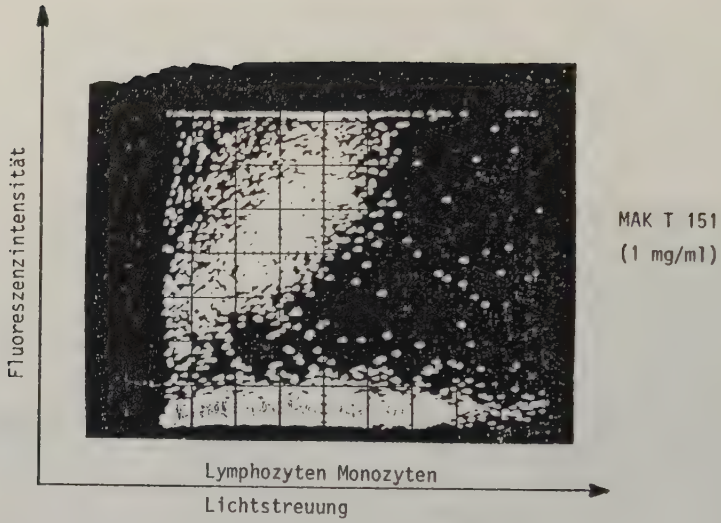


Abb. 2a

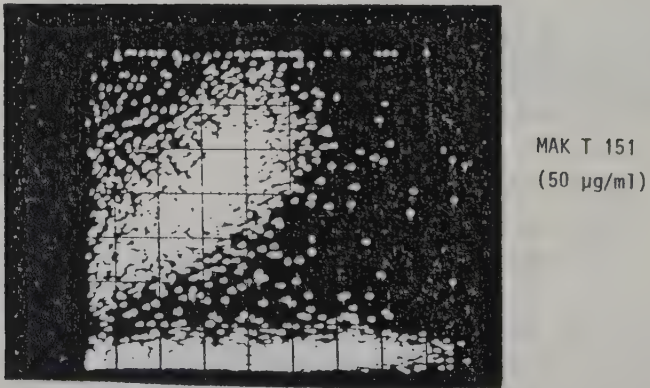
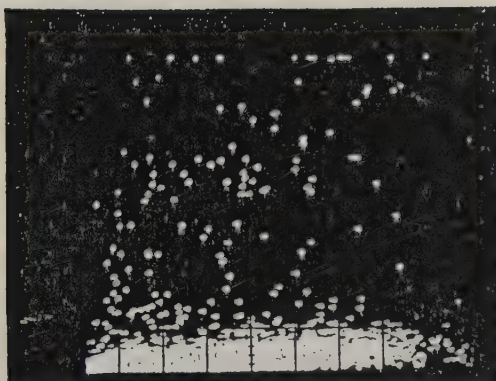


Abb. 2b



MAK 29
(1 mg/ml)

Abb. 2c

Abb. 2: FACS-Analyse von PBL nach Markierung mit den MAK T 151 und MAK 29 in der indirekten Immunfluoreszenz

3.2 Isolierung von Monozyten durch direkte Rosettierung mit Hilfe von MAK M 42

Von vielen Untersuchern wurde versucht, Monozytenpopulationen aufgrund ihrer Fähigkeit zur Adhärenz an Kunststoff oder Glasoberflächen zu reinigen. Dieses Verfahren hat jedoch den Nachteil, daß nicht alle Monozyten (MØ) zur Adhärenz fähig sind und somit eine Subpopulation von MØ ausgewählt wird, die möglicherweise nicht für alle MØ repräsentativ ist. Eigene Untersuchungen haben gezeigt, daß die so gewonnenen MØ höchstens zu 90 % rein sind. In den folgenden Versuchen zur Reinigung von MØ wurde daher eine Anreicherung von MØ über eine Funktion (Adhärenz) vermieden. Statt dessen wurde ein MAK (MAK M 42) gegen ein Oberflächenantigen, das auf allen menschli-

chen Blutmonozyten, jedoch nicht auf Lymphozyten vorkommt (Rieber, persönliche Mitteilung), in Verbindung mit der direkten Rosettierung eingesetzt.

Nach Rosettierung von PBL mit MAK M 42-konjugierten Rindererythrozyten (42-E) wurden die Zellen über einen Percoll-Gradienten zentrifugiert und die MØ so im Sediment angereichert. Durch mikroskopische Inspektion wurde der Anteil der Rosetten im Sediment bestimmt. Die Erythrozyten im Sediment wurden dann durch eine Behandlung mit 0,83 % NH_4Cl lysiert. Es zeigte sich, daß die Reinheit der Rosetten im Sediment stark von der Dichte des verwendeten Gradientenmediums abhing. Tab. 1 zeigt den Anteil von Rosetten im Sediment vor der Lyse der Erythrozyten in Abhängigkeit von einer Anreicherung über Gradienten verschiedener Dichte, wobei sowohl Percoll als auch Ficoll als Gradientenmedium verwendet wurden. Besonders reine MØ-Populationen (99 %) wurden durch eine Zentrifugation über einen Percoll-Gradienten hoher Dichte (1,085 g/ml) gewonnen. Bei niedrigerer Dichte des Gradienten nahm die Kontamination mit lymphoiden Zellen zu.

Die hochgereinigte MØ-Population wurde zusätzlich mit Hilfe eines nach Pappenheim gefärbten Zytozentrifugenpräparates auf ihre Reinheit untersucht. Abb. 3 zeigt eine fast lymphozytenfreie MØ-Population, die an den Kernformen und an der Phygozytose von Erythrozyten deutlich zu erkennen ist.

Tab. 1: Reinheitskontrollen von sedimentierten Monozyten nach Zentrifugation über Percoll-Gradienten verschiedener Dichte oder nach Zentrifugation über Ficoll

	Rosetten vor Lyse	kleine, lymphoide Zellen nach Lyse
Zentrifugation	99 %*	1 %
über Percoll der	99 %	1 %
Dichte 1,085 g/ml		
Zentrifugation	90 %	10 %
über Percoll der	90 %	10 %
Dichte 1,082 g/ml	95 %	5 %
	85 %	15 %
Zentrifugation	60 %	40 %
über Ficoll der	70 %	30 %
Dichte 1,077 g/ml		

* Die mikroskopische Auszählung erfolgte im Hellfeld nach vorheriger Anfärbung der Zellen mit Kristallviolett.

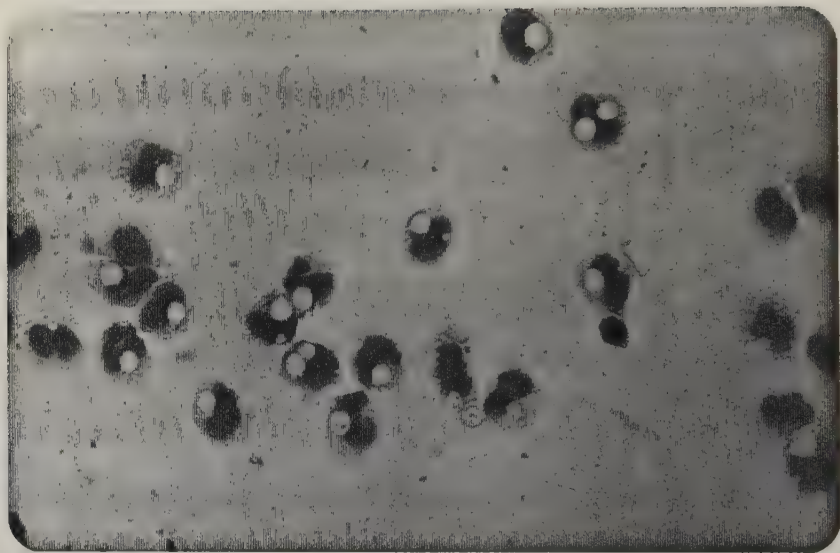


Abb. 3: Zytozentrifugenpräparat von MØ, die durch direkte Rosettierung mit MAK M 42 und Zentrifugation über einen Percoll-Gradienten der Dichte 1,085 g/ml gereinigt worden waren
x 500, Färbung nach Pappenheim

3.3 Spezifischer Nachweis des schwach exprimierten T-Zell-Antigens T4 auf Monozyten (MØ) durch direkte Rosettierung

An gereinigten MØ-Populationen konnte nun untersucht werden, ob die an MØ beobachtete Rosettenbildung mit anti-T4-konjugierten Erythrozyten spezifischer Art war oder ob es sich um Fc-Rosetten handelte.

Dieses Problem wurde mit $F(ab')_2$ -Fragmenten des anti-T4-AK MAK T 151 (IgG 2a) untersucht. Tab. 2 zeigt, daß Erythrozyten, die mit $F(ab')_2$ -Fragmenten von MAK T 151 beschichtet waren, in einem ähnlichen Maße Rosetten mit MØ bildeten wie Erythrozyten, auf die der vollständige MAK gebunden war. Weiterhin ist zu sehen, daß der MAK T 310, der einen anderen Epitop auf dem T4-Molekül erkennt und einem anderen Isotyp (IgG 1) besitzt als MAK T 151 (IgG 2a), ebenfalls 40 bis 80 % Rosetten mit MØ bildet. Als weitere Kontrollen wurden noch Rosettierungen mit MAK T 811 und MAK 29 durchgeführt. MAK T 811 (IgG 1) ist ein anti-T8-AK. MAK 29 (IgG 1) erkennt keine Strukturen auf menschlichen PBL. Tab. 2 zeigt, daß beide AK nicht oder nur in sehr geringem Ausmaße mit MØ rosettierten. Entsprechende Befunde wurden mit den isolierten MØ von 11 Spendern erhoben (Tab. 2a).

Die Abb. 4-6 illustrieren, daß von den verwendeten MAK nur die anti-T4-konjugierten Erythrozyten mit gereinigten MØ Rosetten bildeten.

Gelöste $F(ab')_2$ -Fragmente (100 µg/ml) von MAK T 151 verhinderten die Rosettenbildung mit 151-E im Gegensatz zu den anderen MAK völlig (Tab. 2b). Fc-Rezeptoren sind somit für die Rosettenbildung mit anti-T4-AK nicht verantwortlich.

Als weitere Spezifitätskontrollen wurden Rosettierungsversuche mit verschiedenen menschlichen Zelllinien durch-

geführt. Tab. 2 zeigt, daß von den untersuchten Linien nur die MØ-Linie U 937 und die T-Zell-Linie Jurkat mit anti-T4-konjugierten Erythrozyten zur Rosettenbildung in der Lage waren. Der Kontrollantikörper MAK T 811 bildete nur mit Jurkat-Zellen Rosetten. MAK 29 zeigte mit keiner Zelllinie eine nennenswerte Rosettenbildung. Eine B-Zell-Linie und K 562 (Erythroleukämie) zeigten mit allen verwendeten AK keine oder nur wenige Rosetten.

Die vorgestellten Kontrollversuche zeigen eindeutig, daß die direkte Rosettierung mit monoklonalen anti-T4-AK das Antigen T4 auf 40 bis 80 % der MØ spezifisch nachzuweisen erlaubt.

Die Anzahl und die Qualität der T4-Rosetten waren jedoch abhängig von der Geometrie des Rosettierungsgefäßes und der Rosettierungsdauer. Bis zu drei Stunden nach Beginn der Inkubation nahm die Anzahl der Rosetten zu. Die Rosettierung nach einer Stunde war bei MØ im Gegensatz zu T-Zellen mit anti-T4-AK oft nicht im Plateaubereich (nicht gezeigt). Für eine maximale Rosettenbildung mußte die Rosettierung in konischen Röhrchen mit rundem Boden durchgeführt werden. Eine Rosettierung mit anti-T4-AK gelang nicht, nachdem die MØ in Petri-Schalen adhäriert waren (Abb. 7a). MAK M 42 hingegen, der eine starke Fluoreszenz auf MØ zeigt, rosettierte unabhängig von der Geometrie auch mit adhärenenten MØ in Petri-Schalen (Abb. 7b). Diese Beobachtungen lassen ebenfalls auf eine geringe Dichte der T4-Moleküle auf der MØ-Oberfläche schließen.

Tab. 2a: Anteil gereinigter Monozyten oder Anteil von Zellen menschlicher Zelllinien, der mit Antikörper-beschichteten Erythrozyten Rosetten bildet

Monozyten verschiedener Spender	anti-T4			anti-T8	
	151-E	151-F(ab') ₂ -E	310-E	29-E IgG1-Kontrolle	811-E
1	-	-*	60	0	3
2	-	-	70	0	1
3	-	-	80	0	1
4	80	-	80	0	3
5	80	-	80	0	1
6	-	-	70	0	4
7	80	-	80	1	5
8	80	80	80	0	3
9	60	60	60	0	5
10	40	40	50	0	3
11	50	50	50	1	4
<u>Zell-Linien</u>					
U 937	90	80	90	1	0
B-Zell-Linie	3	1	3	1	0
Jurkat	80	80	80	0	80
K 562	0	0	0	0	0

* nicht getestet

Tab. 2b: Inhibitionsversuche der T4-spezifischen Rosettenbildung reiner MØ-Populationen mit verschiedenen MAK

MAK (100 µg/ml)	Vorinkubation mit				
	Ø	151-F(ab') ₂	310	811	29
Exp. 1: % Rosetten mit 151-E	60	0	60	60	60
Exp. 2: % Rosetten mit 151-E	50	0	60	50	50

1×10^5 MØ wurden 15 min mit Medium oder den angegebenen gelösten MAK (100 µg/ml) auf Eis inkubiert und dann mit einem Überschuß von 151-E für 3 Stunden rosettiert. Der Anteil der Rosetten mit 151-E (% Rosetten) wurde nach Anfärbung der MØ mit Kristallviolett im Hellfeld ausgezählt.

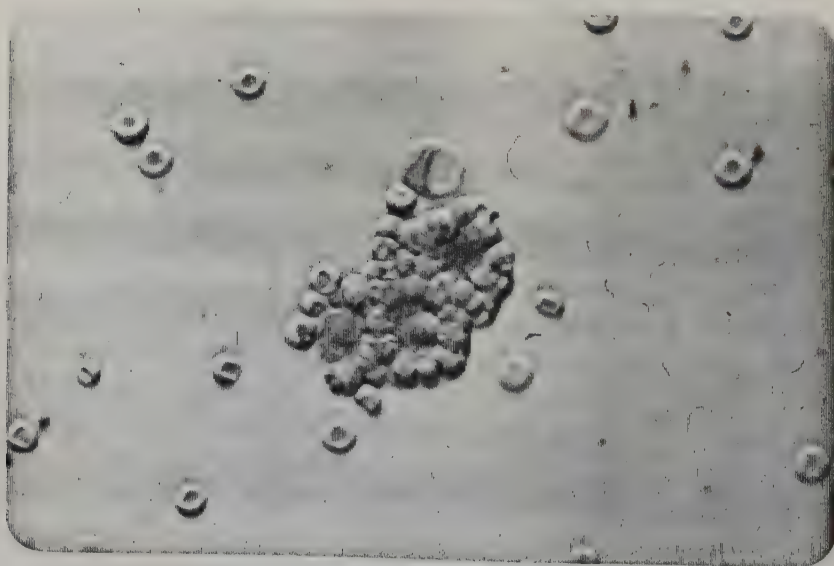


Abb. 4: Rosettierung von gereinigten MØ mit F(ab')₂-Fragmenten des anti-T4-AK MAK T 151
x 1000

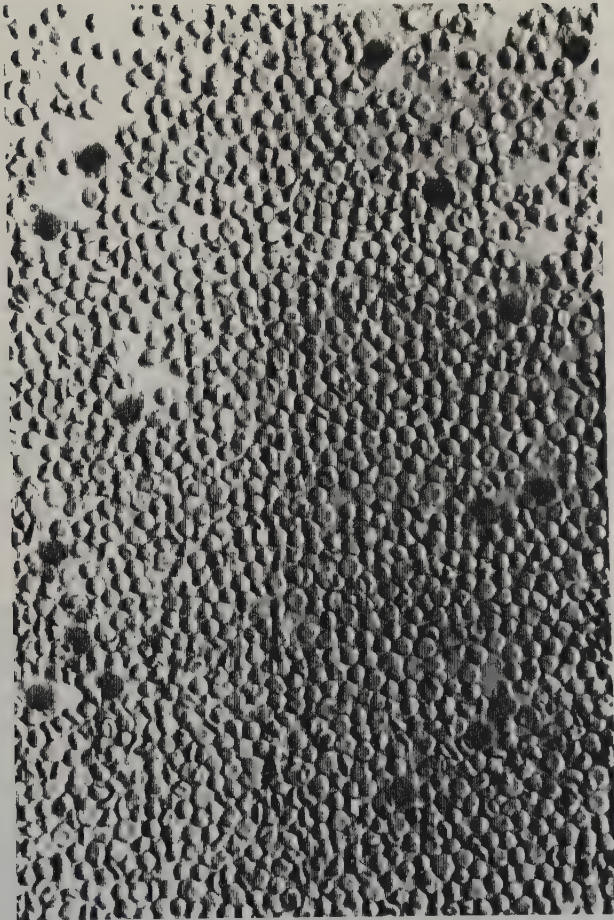


Abb. 5: Rosettierung von gereinigten MØ mit dem anti-T8-
AK MAK T 811
x 500



Abb. 6: Rosettierung von gereinigten MØ mit dem MAK 29
x 500

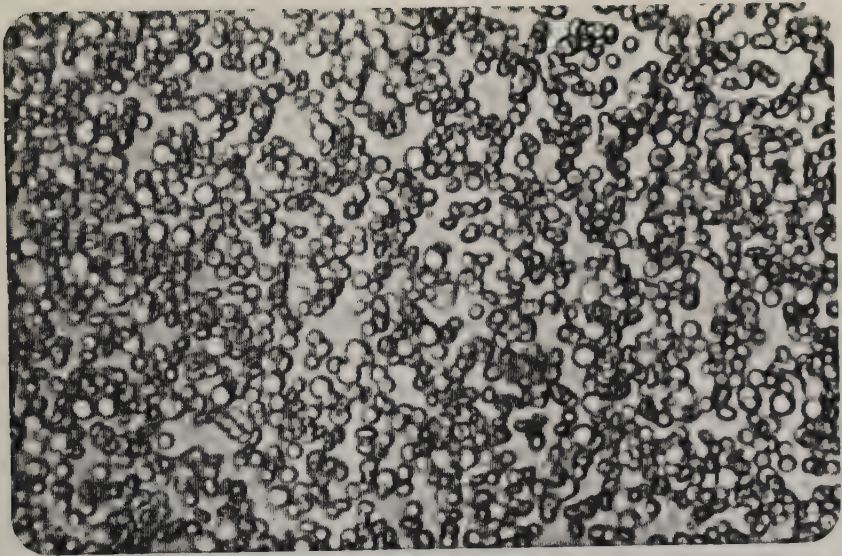


Abb. 7a: Rosettierung von adhärenen MØ mit dem anti-T4-AK MAK T 151

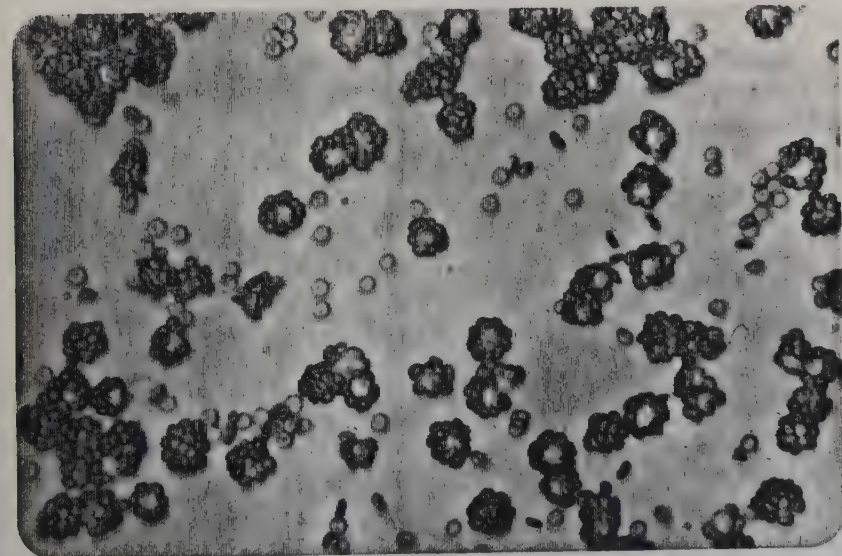


Abb. 7b: Rosettierung von adhärenen MØ mit dem anti-MØ-AK MAK M 42
x 500

Da bei den verschiedenen untersuchten Spendern der Anteil der MØ, die das Antigen T4 exprimieren, sich zwischen 40 und 80 % bewegte, ergab sich die Frage, ob es sich bei den T4⁺ und T4⁻ Monozyten um funktionell unterschiedliche Populationen handelte. Daher wurde versucht, die MØ mit Hilfe der direkten Rosettierungstechnik in T4-positive und -negative Populationen aufzutrennen, um anschließend in MØ-abhängigen Testsystemen nach einer möglichen Funktion des Antigens T4 auf MØ zu suchen. Es sollte die Bedeutung der aufgetrennten MØ-Populationen bei der

- 1) Mitogen-induzierten Proliferation von T-Zellen,
- 2) bei der Präsentation von löslichem Antigen und schließlich
- 3) bei der Alloantigen-stimulierten Proliferation von T-Zellen untersucht werden.

Die Auftrennung der rosettierten MØ erfolgte in ähnlicher Weise wie die Separation von T-Zellen aus PBL nach Rosettierung mit Schafserythrozyten über einen Ficoll-Gradienten. Um die Proliferation von T-Zellen in Abhängigkeit von T4-positiven und -negativen MØ untersuchen zu können, mußten zunächst reine, MØ-freie T-Zell-Populationen hergestellt werden.

3.4 Isolierung von T-Zellen durch direkte Rosettierung

Ähnlich wie MØ wurden T-Lymphozyten durch Rosettierung angereichert. Statt des anti-MØ-AK MAK M 42 wurde der T-Lymphozyten spezifische MAK T 910 verwendet. MAK T 910 erkennt den Schafserythrozyten-Rezeptor auf menschlichen T-Zellen. Die rosettierten Zellen wurden über einen Percoll-Gradienten zentrifugiert und die Erythrozyten im Sediment wurden lysiert.

Vor der Lyse enthielt das Sediment 98 % Rosetten. Nach

der Lyse wurden die gereinigten Lymphozyten mit anti-T4-Erythrozyten und anti-T8-Erythrozyten zugleich rosettiert. Die Summe der T4-positiven und der T8-positiven Zellen sollte die Gesamtzahl der T-Zellen ergeben. Die Rosettenbildung betrug 98 % (nicht gezeigt).

Die gereinigten T-Zellen wurden hinsichtlich einer möglichen MØ-Kontamination untersucht. Hierfür wurden die T-Zellen mit MAK M 42-konjugierten Rindererythrozyten rosettiert. Der Anteil kontaminierender MØ betrug in allen Fällen 0,5 bis 1 % (nicht gezeigt). In manchen Fällen wurden die rosettierten MØ durch eine Zentrifugation über Ficoll aus der T-Zell-Population entfernt (T 42⁻). In der T 42⁻-Population lag der MØ-Anteil unter 0,1 %.

3.5 Auftrennung von MØ in T4-positive und T4-negative MØ durch direkte Rosettierung

Bei den Arbeiten zur Auftrennung von MØ in T4-positive und -negative Populationen fiel auf, daß wegen der geringen Antigendichte viele Rosetten offensichtlich nicht stabil waren. Für die Zentrifugation wurde daher ein Gradient niedriger Dichte gewählt mit dem Ziel, auftretende Scherkräfte gering zu halten. Andererseits sedimentierten bei der Zentrifugation über Ficoll auch MØ-Aggregationen, in denen T4-negative MØ eingeschlossen waren. Die Neigung zur Aggregatbildung von gereinigten MØ ist deutlich größer als die von nicht gereinigten MØ der Lymphozytenfraktion. Die Aggregatbildung wurde durch einen großen Überschuß von Erythrozyten, die die MØ voneinander räumlich isolieren sollten, verringert.

Das T4-angereicherte Sediment (MØ 310⁺, MØ 151⁺) enthielt vor der Lyse der Erythrozyten mit NH₄Cl ca. 80 bis 90 % Rosetten. Diese MØ-Population war wegen aggregierter T4-negativer MØ im Vergleich zu ungetrennten MØ mit

$T4^+$ MØ nur angereichert. Sie unterschied sich somit nicht hinreichend von ungetrennten MØ, die oft bis zu 80 % $T4$ -positive MØ enthielten. In einigen Versuchen wurde daher die $T4$ -positive MØ-Population durch nicht aufgetrennte MØ (MØ 42^+) ersetzt.

Die Reinheit der $T4$ -negativen MØ-Population (bezeichnet als MØ 310^- oder MØ 42^+151^-) wurde durch erneute Rosettierung mit anti- $T4$ -Erythrozyten und durch Kontrollrosettierungen mit MAK 29 und Kaninchen-anti-Maus-IgG-beschichteten Erythrozyten überprüft. Ca. 5 % schwach ausgebildeter Rosetten (< 4 Erythrozyten/Rosette) waren bei erneuter Rosettierung mit anti- $T4$ -E in der $T4$ -negativen Population noch zu sehen. Die anderen Kontrollrosettierungen zeigten keine Rosettenbildung.

3.6 Stimulation von T-Zellen durch PHA in Gegenwart

$T4$ -positiver und $T4$ -negativer MØ

50 000 gereinigte T-Zellen wurden mit 5000 $T4$ -positiven und -negativen MØ gemischt und für drei Tage mit PHA stimuliert. Als positive Kontrolle dienten nicht aufgetrennte PBL. Wie Abb. 8 zeigt (eines von drei Experimenten), proliferierten gereinigte T-Zellen mit PHA in der Abwesenheit von MØ nur sehr wenig. Bei der Zugabe von MØ trat in Anwesenheit von PHA eine starke Stimulation der T-Zellen auf. Dabei war kein Unterschied in Gegenwart $T4$ -positiver, $T4$ -negativer oder ungetrennter MØ feststellbar.

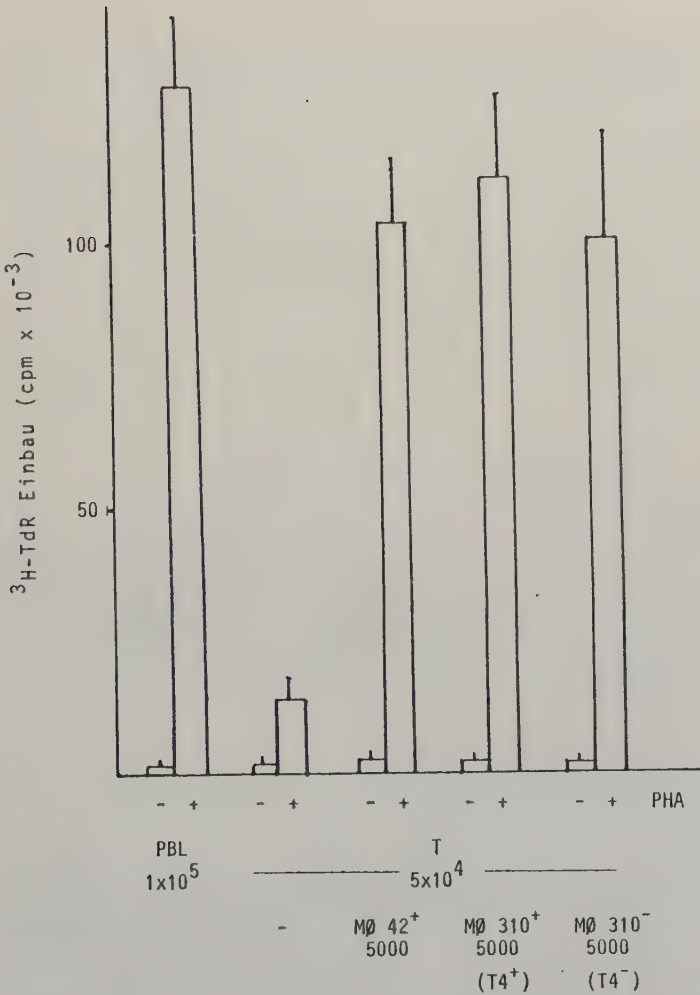


Abb. 8: Einfluß T4-positiver und T4-negativer Monozyten auf die PHA-induzierte Proliferation gereinigter T-Zellen

3.7 Stimulation von T-Zellen durch lösliches Antigen in Gegenwart T4-positiver und T4-negativer MØ

In ähnlicher Weise wurde der Einfluß verschiedener MØ-Populationen auf die durch lösliches Antigen induzierte Proliferation gereinigter T-Zellen untersucht (Abb. 9, eines von zwei Experimenten). Gereinigte T-Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen (1000/5000) verschiedener MØ-Populationen gemischt und für 5 Tage mit Tetanus-Toxoid (TT) oder gereinigtem Tuberkulin-Extrakt (PPD) in einer Konzentration von 5 µg/ml stimuliert. Die Stimulation war abhängig von der Gegenwart von MØ und Antigen. In beiden Titrationsstufen konnten T4-positive und T4-negative MØ gleichermaßen die Proliferation von T-Zellen unterstützen.

Ein weiterer wesentlicher Befund dieser Versuche war, daß die direkte Rosettierungsmethode und der damit verbundene Lyse-Schritt die Funktionsfähigkeit der Zellen nicht beeinträchtigte.

3.8 Stimulation von T-Zellen durch allogene T4-positive und T4-negative MØ

In einem weiteren Experiment (Abb. 10) wurde untersucht, ob das T4-Antigen auf MØ bei der Stimulation von T-Zellen durch allogene MØ von Bedeutung ist. 5×10^4 MØ-freie T-Zellen ($T 42^-$) wurden mit 1000 bzw. 10 000 autologen, adhärennten MØ oder ungetrennten ($MØ 42^+29^-$) und T4-negativen ($MØ 42^+151^-$), allogenen MØ für fünf Tage inkubiert. Um einen möglichen negativen Einfluß einer zweiten Rosettierung auszuschließen, wurde die unseparierte MØ-Population, die in diesem Falle die T4-angereicherte Population vertrat, zusätzlich mit MAK 29 rosettiert und über Ficoll zentrifugiert ($MØ 42^+29^-$).

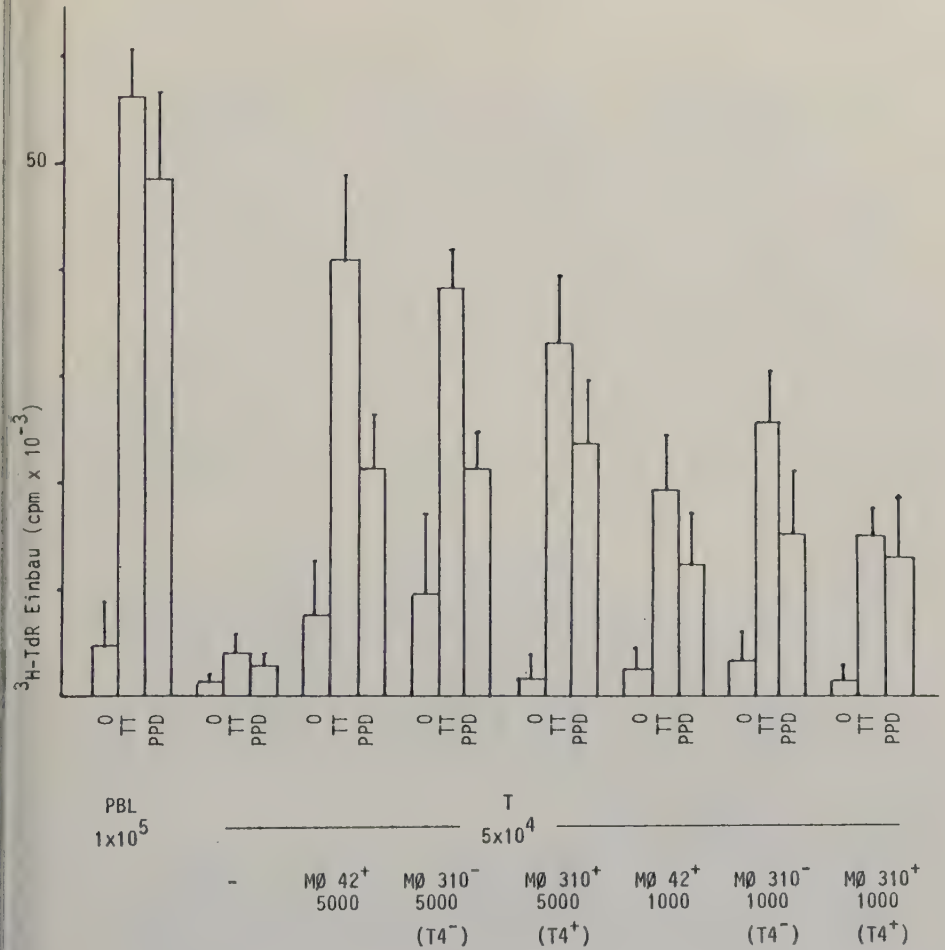


Abb. 9: Einfluß T4-positiver und T4-negativer Monozyten auf die durch lösliches Antigen induzierte Proliferation gereinigter T-Zellen

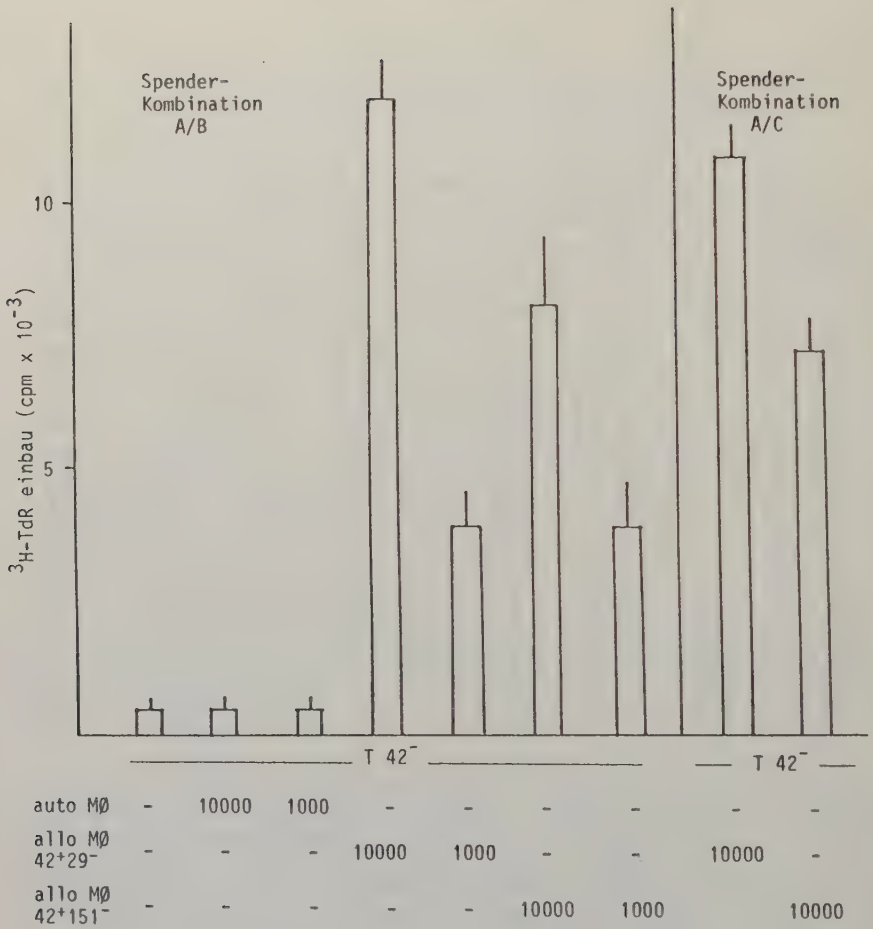


Abb. 10: Stimulation allogener T-Zellen mit T4-negativen und ungetrennten M0

Von den zwei verwendeten Spendern stimulierten beide MØ-Populationen allogene T-Zellen. Die T4-negative Population stimulierte allogene T-Zellen in beiden Fällen jedoch etwas weniger als die ungetrennten MØ. Da dieser geringe Unterschied bei Titration der MØ verschwand, dürften die wenigen Prozent T4-positiver MØ in der T4-negativen Population keinen Einfluß haben, der einen möglichen Unterschied zwischen beiden Populationen bei der Stimulation allogener T-Zellen verschleiern könnte.

Diese Versuche zeigen ebenfalls, daß die T-Zellen und MØ nach ihrer Reinigung durch die direkte Rosettierungstechnik in ihren Funktionen offenbar nicht eingeschränkt waren.

3.9 Bildung Antigen-spezifischer Antikörper in vitro und Regulation der spezifischen Sekretion durch verschiedene T-Zell-Populationen nach Reinigung von B-Zellen und T-Zell-Subsets durch direkte Rosettierung

Die Eignung der direkten Rosettierungsmethode für die Elimination von Zellpopulationen wurde in einem Meßsystem für eine Antigen-spezifische Antikörper-Bildung in vitro überprüft. Dieses System gilt bei Verwendung menschlicher Lymphozyten allgemein als sehr störanfällig (4, 7, 56, 120). In dem verwendeten System konnte die Kooperation von B-Zellen mit T-Zellen bzw. T-Zell-Subpopulationen bei der in vitro Sekretion spezifischer AK gegen Tetanus-Toxoid (TT) untersucht werden. Hierfür mußten sowohl B-Zellen von T-Zellen befreit werden als auch T-Zellen und T-Zell-Subpopulationen isoliert werden. B-Zellen wurden durch die vollständige Entfernung von

T-Zellen mit Hilfe von Rinder-Erythrozyten, die mit einem MAK gegen den E-Rezeptor auf menschlichen T-Zellen (MAK T 910) konjugiert waren, angereichert. Die rosettierten T-Zellen wurden durch Zentrifugation über Ficoll entfernt. In der Interphase blieben B-Zellen (ca. 30 %), Null-Zellen und MØ zurück. Der Anteil kontaminierender T-Zellen lag meist unter einem Prozent (bestimmt durch IF mit verschiedenen anti-T-Zell-Antikörpern und durch Rerosettierung mit MAK T 910-E (Daten nicht gezeigt)). T8-positive T-Zell-Subpopulationen wurden durch direkte Rosettierung mit MAK T 811 und Zentrifugation über Ficoll aus gereinigten T-Zellen abgetrennt. Zurück blieben T4-positive (Helfer)-T-Zellen. Der Anteil kontaminierender T8-positiver Zellen lag unter einem Prozent.

Angereicherte B-Zellen (5×10^4) wurden mit verschiedenen Mengen von T-Zellen oder T8-negativen (T 811⁻)-T-Zell-Subpopulationen und einer optimalen Konzentration von TT (10 ng/ml) stimuliert (Abb. 11). Nach 10 Tagen wurden durch ELISA anti-TT-Antikörper und Gesamt-IgG und -IgM in den Kulturüberständen gemessen. Anti-TT-AK waren in mindestens zwei von drei parallel angesetzten Kulturen bei immunisierten Spendern nachweisbar. Spender, die nicht kurz vor Blutentnahme immunisiert worden waren, zeigten bei verschiedenen Kulturbedingungen meist keine reproduzierbar, spezifische in vitro Antwort. Die Wirkung einer Immunisierung auf die in vitro Sekretion spezifischer AK trat ca. eine Woche nach der Immunisierung auf und hielt ca. vier Wochen an (nicht gezeigt).

Abb. 11 (einer von drei Versuchen) zeigt, daß 16 Tage nach einer Immunisierung durch die Zugabe von TT zu den Kulturen spezifische anti-TT-AK induzierbar waren. Die Antigen-spezifische Sekretion stieg nach Zugabe T8-depletierter T-Zellen ebenso wie die Gesamt-IgG/IgM-Sekretion an. Die Zunahme der Antigen-spezifischen Sekretion war besonders deutlich bei Zugabe geringer Mengen von

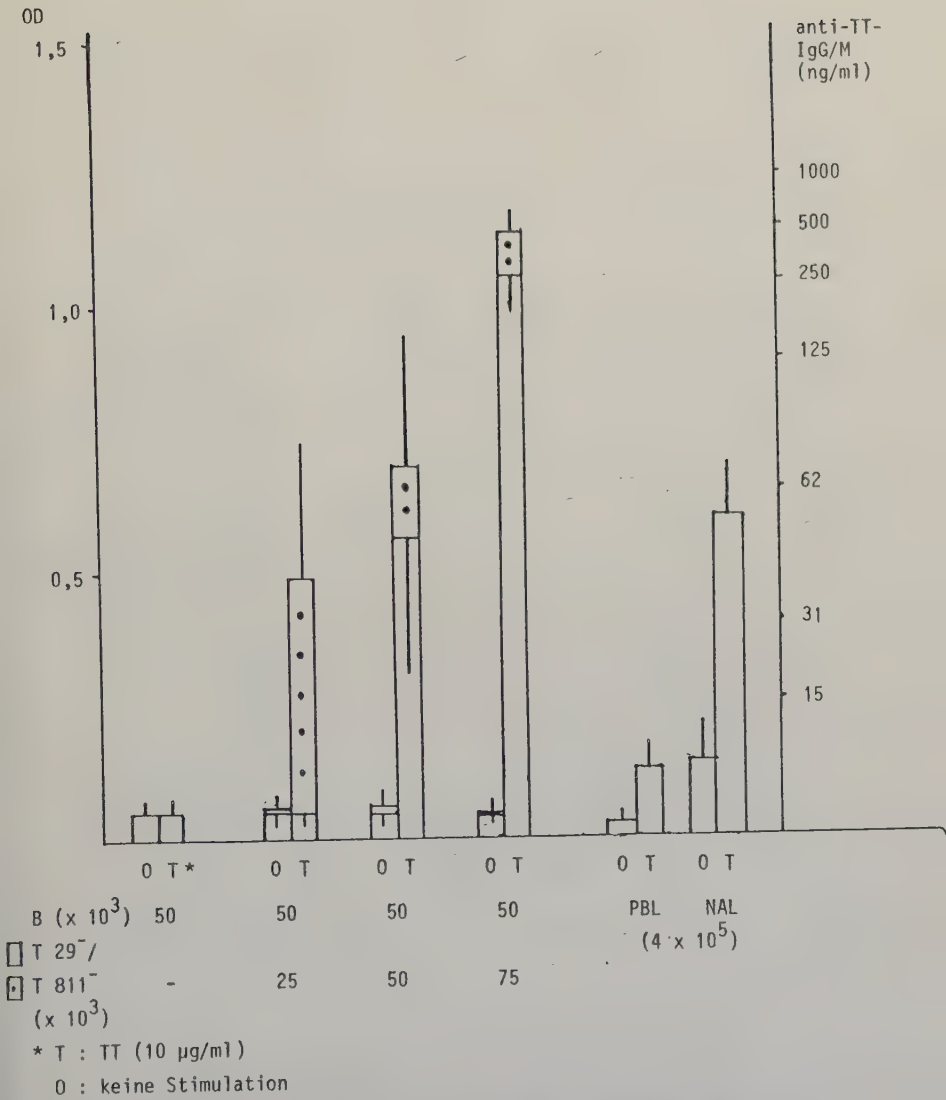


Abb. 11a: TT-spezifische Sekretion gereinigter B-Zellen in vitro unter dem Einfluß verschiedener T-Zell-Populationen nach Immunisierung in vivo

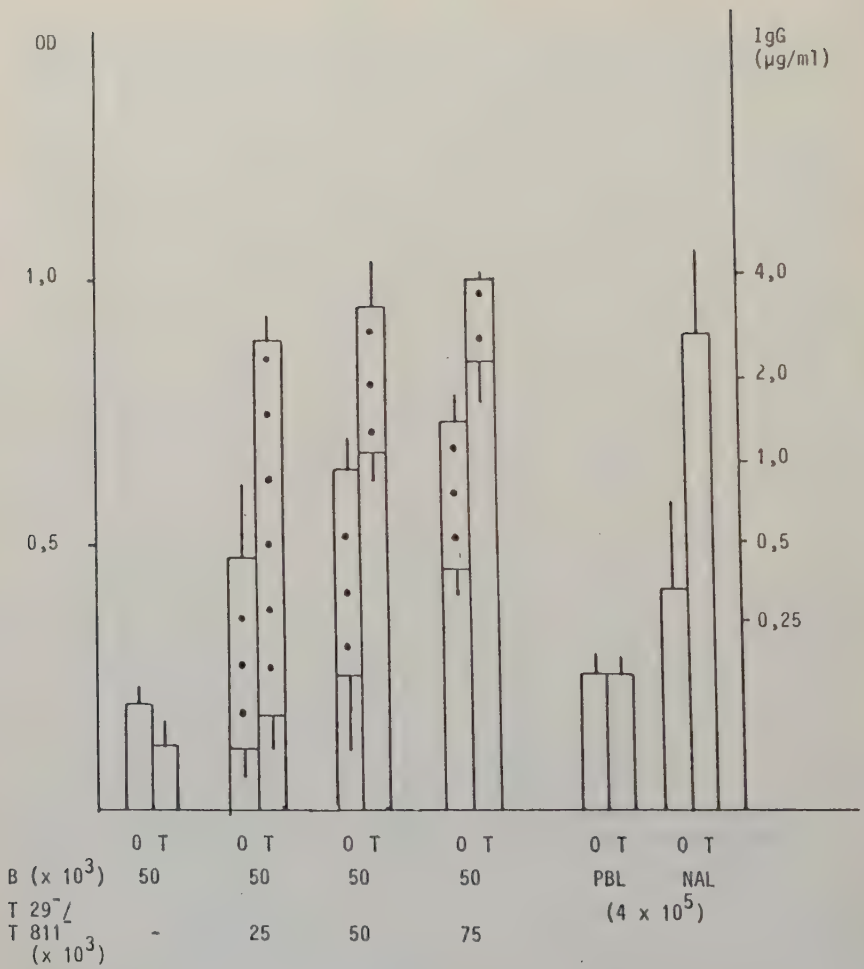


Abb. 11b: IgG-Sekretion gereinigter B-Zellen in vitro unter dem Einfluß verschiedener T-Zell-Populationen nach Immunisierung in vivo

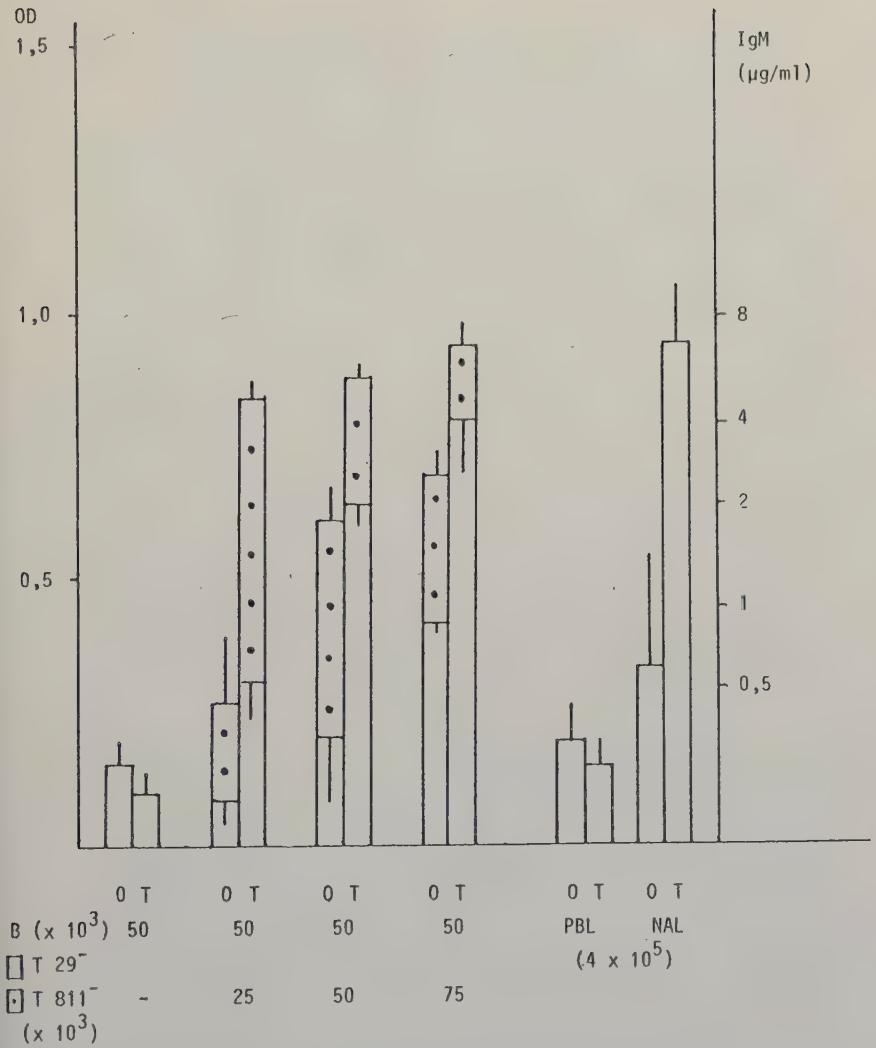


Abb. 11c: IgM-Sekretion gereinigter B-Zellen in vitro unter dem Einfluß verschiedener T-Zell-Populationen nach Immunisierung in vivo

T8-negativen Zellen und wurde mit steigenden Mengen dieser Zellen im Vergleich mit steigenden Mengen ungetrennter T-Zellen undeutlicher. Auffallend war, daß die Stimulation mit geringen Konzentrationen TT neben einer spezifischen auch zu einer starken polyklonalen IgG/IgM-Sekretion führte. Nach Plastikadhärenz zeigte die unaufgetrennte, nicht Adhärenz Lympozytenpopulation (NAL) im Vergleich mit PBL eine verstärkte spezifische und polyklonale Sekretion.

Dieser Versuch zeigt, daß mit der direkten Rosettierungsmethode Zellpopulationen aufgetrennt und isoliert werden können, die auch in einem Antigen-spezifischen Kultursystem funktionsfähig sind und den Einfluß regulatorischer T-Zellen auf eine spezifische in vitro Antwort zu untersuchen gestatten.

3.10 Anwendung der direkten Rosettierungstechnik mit MAK bei Knochenmarktransplantationen

Bei der hohen Empfindlichkeit und der großen Effizienz der direkten Rosettierungstechnik mit MAK in den beschriebenen Laborversuchen lag es nahe, diese Methode auch auf ihre Eignung zur Reinigung von Knochenmarktransplantaten hin zu untersuchen. Hierbei ist eine möglichst vollständige Elimination von T-Lymphozyten zur Vermeidung einer GVH-Krankheit bei allogenen Transplantationen oder von leukämischen Zellen bei autologen Transplantationen von Bedeutung.

Um den Einsatz dieser Methode bei Knochenmarktransplantationen (KMT) zu rechtfertigen, mußte sie in ihrer Effizienz mit schon angewandten Verfahren verglichen werden. Bereits im Einsatz ist die Komplement-vermittelte Lyse nach Inkubation des Knochenmarks (KM) mit MAK gegen T-Lymphozyten oder leukämische Zellen sowie die Entfer-

nung von T-Lymphozyten als Spontanrosetten mit Schafs-erythrozyten.

3.10.1 Vergleich der direkten Rosettierung mit der Komplement-Lyse

3.10.1.1 Elimination von T-Zellen

Bei allogenen KMT ist eine möglichst vollständige Elimination von T-Zellen anzustreben. Da als Komplement-aktivierender MAK gegen T-Zellen nur ein anti-T4-AK (MAK T 151, IgG 2a) zur Verfügung stand, wurde mit Hilfe dieses AK die Fähigkeit der direkten Rosettierungstechnik und der Komplement-Lyse zur Elimination von T-Zellen (hier also T4-positiver T-Zellen) verglichen. Die Komplement-Lyse wurde durch Markierung von AET-SE-gereinigten T-Zellen mit MAK T 151 und anschließender Zugabe verdünnten Kaninchen-Komplements unter dreimaliger Wiederholung dieses Verfahrens nach dem Protokoll von Ritz et al. (95) durchgeführt.

Tab. 3 zeigt, daß die direkte Rosettierung mit MAK T 151 die T4-positiven T-Zellen wirkungsvoller entfernt als die komplementvermittelte Lyse. Der Anteil kontaminierender T4-positiver Zellen wurde im Falle der direkten Rosettierung durch Rerosettierung mit 151-E und Rosettierung mit 310-E (MAK 310 erkennt anderen Epitop auf T4) sowie durch IF mit verschiedenen anti-T4-AK und im Falle der Komplement-Lyse nur durch IF mit verschiedenen anti-T4-AK bestimmt.

Tab. 3: Vergleich direkte Rosettierung - Komplementlyse bei der Entfernung von T4-positiven T-Zellen

1. Rosettierung	: 0/1000	} Kontrolle durch Rosettierung mit 151-E und 310-E
2. Rosettierung	: 0/2000	
1. Lyse	: 5/100	} Kontrolle durch IF
2. Lyse	: 6/1000	
3. Lyse	: 2/1000	

3.10.1.2 Elimination von leukämischen Zellen

Für manche ALL ist ein Oberflächenantigen (sog. common ALL-Antigen, cALLA) charakteristisch, das u.a. von dem MAK VIL A 1 erkannt wird. MAK VIL A 1 wurde in Wien am Institut für Immunologie (Prof. Dr. Knapp) hergestellt und charakterisiert. MAK VIL A 1 (IgM) aktiviert Komplement und wurde daher für den Vergleich von direkter Rosettierung und Komplementlyse bei der Elimination von leukämischen, cALLA-positiven Zellen aus autologem KM eingesetzt.

Tab. 4 zeigt einen Vergleich der direkten Rosettierung mit einer dreimaligen Komplementlyse unter Verwendung des von Prof. Dr. Knapp zur Verfügung gestellten MAK VIL A 1 bei dem Versuch, leukämische Zellen mit hoher cALL-Antigen-Dichte (charakterisiert durch starke IF mit MAK VIL A 1) aus autologem KM zu entfernen. Der Anteil verbliebener cALL-positiver Zellen wurde durch indirekte IF mit MAK VIL A 1 und Rerosettierung mit VIL A 1-E bestimmt. Es ist deutlich, daß die Elimination von cALL-positiven Zellen nach direkter Rosettierung mit MAK VIL A 1 vollständiger ist als nach Komplement-Lyse unabhängig vom ursprünglichen Anteil (20 %, 50 %) der leukämischen Zellen im KM.

Tab. 5 zeigt, daß bei geringer cALLA-Dichte (schwache IF mit MAK VIL A 1) die Elimination durch direkte Rosettierung mit VIL A 1-E wesentlich bessere Ergebnisse erreicht als die komplementvermittelte Lyse mit dem gleichen MAK. Bei niedriger Antigendichte gelingt es mit Hilfe von Kaninchen-anti-Maus-Ig konjugierten Erythrozyten nach der 3. Lyse noch, 16 % VIL-A1 markierte Zellen nachzuweisen, während direkt konjugierte VIL-A1-E nach der 2. Rosettierung weniger als 0,1 % Rosetten bilden. Bei der Komplement-Lyse kann eine direkte Rosettierung als Reinheitskontrolle nicht durchgeführt werden, weil die Oberflächen der nicht lysierten Zellen vom Antikörper noch besetzt sind.

Tab. 4: Vergleich der direkten Rosettierung mit der Komplementlyse bei der Elimination von cALLA-positiven Zellen hoher Antigendichte aus autologem KM

Ausgang	Direkte Rosettierung mit VIL-A1-E		Komplement-Lyse		
	1. Ros.	2. Ros.	1. Lyse	2. Lyse	3. Lyse
20*	0,1	< 0,05	3	3	1
50	< 0,1	< 0,05	2	2	1

* % positive Zellen in der indirekten Immunfluoreszenz

Tab. 5: Vergleich der direkten Rosettierung mit der Komplementlyse bei der Elimination von cALLA-positiven Zellen niedriger Antigendichte aus autologem KM

	Ausgang	Rosettierung mit VIL-A1-OxE		Komplement-Lyse		
		1. Ros.	2. Ros.	1. Lyse	2. Lyse	3. Lyse
% pos. in IF	22	< 1	< 0,1	22	11	8
% VIL-A1-E	30	3	< 0,1	0	0	0
% Rosetten mit Kaninchen-anti- Maus-Ig-E	0	0	0	24	18	16

3.10.2 Vergleich der direkten Rosettierungstechnik mit anderen Rosettierungsmethoden hinsichtlich der Rosettenstabilität

Eine wichtige Voraussetzung für eine effektive Abtrennung von Zellen durch Rosettierung ist die mechanische Stabilität der Rosetten, d.h. ihre Widerstandsfähigkeit gegen Scherkräfte und Beschleunigungskräfte.

Zwei zur direkten Rosettierungstechnik alternative Rosettierungsverfahren wurden hinsichtlich ihrer mechanischen Stabilität miteinander verglichen. Es handelte sich um eine indirekte Rosettierung und um die Spontanrosettierung von T-Zellen mit Schafserythrozyten.

Die Rosetten wurden zum Überprüfen der mechanischen Stabilität mit einer Kraft von einem kp mehrfach durch eine enge Kanüle ($\emptyset$ 0,7 mm) gepreßt. Der Anteil übriggebliebener Rosetten wurde im Mikroskop ausgezählt.

3.10.2.1 Vergleich Direkte Rosettierung - Indirekte Rosettierung

Direkte Rosetten von NAL mit MAK T 811 und MAK T 151 wurden mit den entsprechenden indirekten Rosetten in ihrer Stabilität verglichen. Für die indirekte Rosettierung wurden NAL mit 50 $\mu\text{g/ml}$ des gereinigten MAK inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Zellen wurden diese mit Rindererythrozyten rosettiert, die mit einem Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulin konjugiert waren. Abb. 12 zeigt, daß bereits nach einer Passage die indirekten Rosetten weitgehend zerstört waren, während die direkten Rosetten auch bei mehreren Passagen durch die Kanüle zum größten Teil unversehrt blieben.

Rosetten %

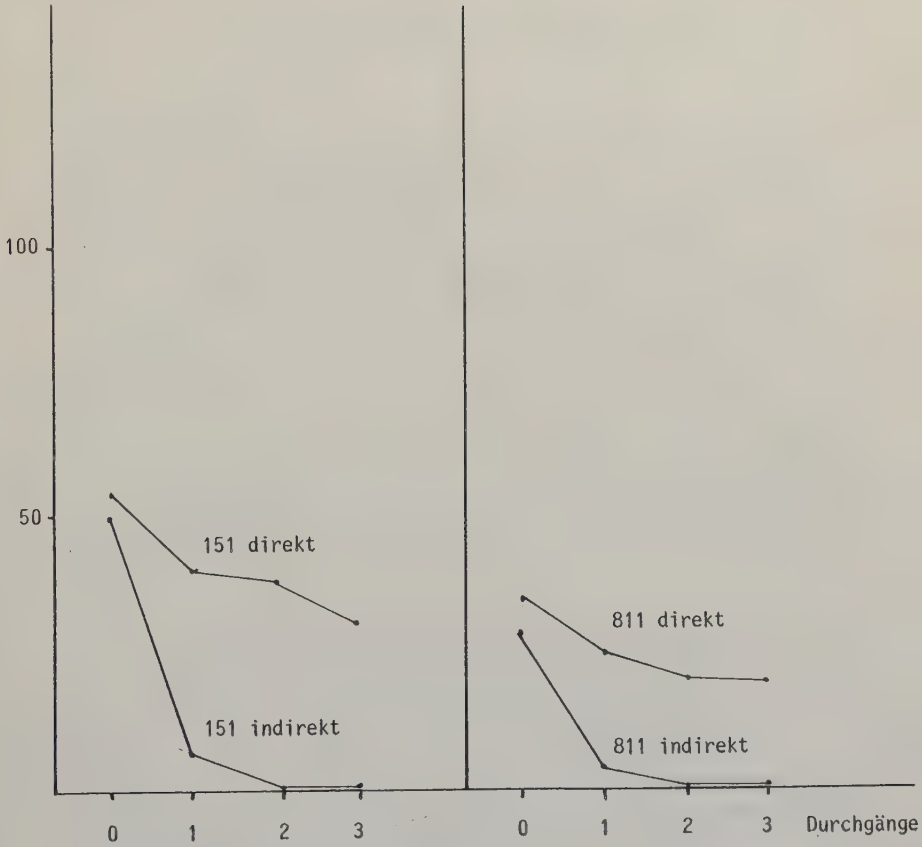


Abb. 12: Stabilitätsvergleich direkter und indirekter Rosetten

3.10.2.2 Vergleich Direkte Rosettierung - Spontan- rosettierung mit Schafserythrozyten

Direkte Rosetten mit MAK T 910-konjugierten Rinder-Erythrozyten wurden mit Rosetten menschlicher T-Zellen, die sich spontan mit gewaschenen Schafserythrozyten (SE) oder mit AET-behandelten Schafserythrozyten (AET-SE) bilden, in ihrer mechanischen Stabilität verglichen. Hierzu wurden PBL, die mit den erwähnten drei verschiedenen Erythrozytenpopulationen zwei Stunden rosettiert worden waren, dem bereits erwähnten Stabilitätstest unterworfen.

Abb. 13 zeigt einen von mehreren Versuchen, aus dem hervorgeht, daß die Rosetten der mit MAK T 910 direkt konjugierten Rindererythrozyten (910-E) bei mechanischer Belastung wesentlich stabiler waren als die mit Schafserythrozyten gebildeten Rosetten.

3.10.3 Untersuchungen zur Differentiationsfähigkeit von Stammzellen in KM nach einer direkten Rosettierung

Obwohl MAK T 910, der zur Entfernung von T-Zellen aus KM bei allogenen Transplantationen eingesetzt werden sollte, als ein für den E-Rezeptor von T-Zellen spezifischer MAK charakterisiert worden war, bestand die Möglichkeit, daß bei der gezeigten hohen Effizienz und Empfindlichkeit der direkten Rosettierungsmethode auch Stammzellen mit eliminiert werden könnten. Auch könnte das Rosettierungsverfahren selber (z.B. die Zentrifugation über Ficoll) zu einer Schädigung oder zu einem Verlust von Stammzellen führen. In Ermangelung eines sicheren Nachweissystems für Stammzellen wird oft ein in vitro Kultursystem

Rosetten %

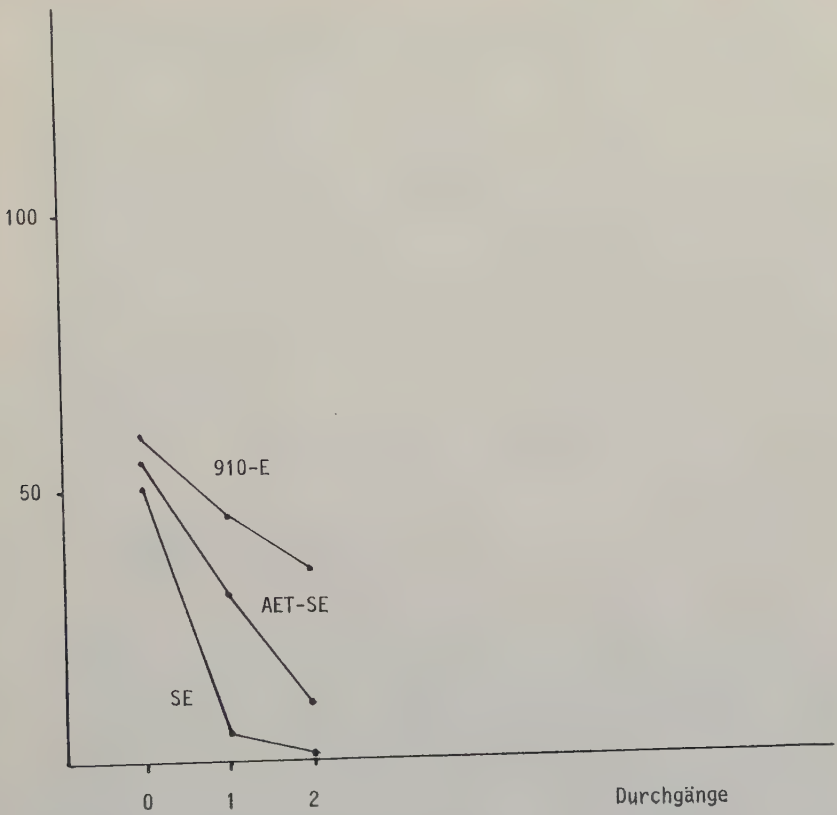


Abb. 13: Stabilitätsvergleich von Rosetten mit MAK T 910

für KM-Zellen benutzt, das das Wachsen von Granulozyten- und Monozyten-Kolonien aus undifferenzierten KM-Zellen erlaubt und als CFU-c Verfahren bezeichnet wird (Colony/Cluster Forming Units in culture).

Zur Untersuchung der oben erwähnten Fragestellung wurden KM-Aliquote von drei Spendern, nachdem autologe Erythrozyten mit Hilfe eines Zellseparators und durch Zentrifugation über Ficoll entfernt worden waren, einer Rosettierung mit MAK T 910-konjugierten Erythrozyten mit anschließender Zentrifugation über Ficoll unterzogen. Die verbliebenen, T-Zell-depletierten KM-Zellen wurden mit dem CFU-c-Verfahren auf ihre Fähigkeit zur Bildung von reifen Zellen der myeloischen Reihe untersucht. Diese Untersuchungen wurden an der Dr. von Haunerschen Kinderklinik (München) in der Abteilung von Prof. Dr. Haas durchgeführt.

Tab. 6 zeigt, daß die KM-Stammzellen nach der direkten Rosettierung mit MAK T 910 angereichert und zur terminalen Differenzierung in der Lage waren.

Tab. 6: CFU-c nach Auftrennung von Knochenmarkzellen
(pro 1×10^5 eingesetzte Zellen)

		KM-Spender		
		R.B.	W.B.	S.S.
I	Nach Separator	56	80	22
II	Nach Fikoll	115	232	34
III	Nach Rosettierung mit 910-E	311	284	67

3.10.4 Anwendung der direkten Rosettierungsmethode mit
MAK T 910 bei der Entfernung von T-Zellen aus
allogenen KM

Nachdem das direkte Rosettierungsverfahren mit MAK T 910 in seiner Effizienz und Unbedenklichkeit bezüglich der Differenzierungsfähigkeit vom Stammzellen untersucht worden war, wurde es in einem Falle einer allogenen KMT angewandt. KM eines 12jährigen Mädchens, dessen HLA-identischer, 15jähriger Bruder (S.R.) an einer AML erkrankt war (Patient von Prof. Dr. Haas, Dr. von Haunersche Kinderklinik, München), wurde aus dem Becken gewonnen und teilweise von autologen Erythrozyten durch einen Zellseparator befreit. Die gewonnenen 2×10^{10} KM-Zellen wurden anschließend durch eine Zentrifugation über Ficoll von einem verbliebenen, ca. 50fachen Erythrozyten-Überschuß befreit. Die verbliebenen 8×10^9 Zellen wurden für zwei Stunden mit einem Überschuß an MAK T 910-konjugierten Rindererythrozyten (910-E) bei 4°C rosettiert und dann bei einer Zelldichte von 8×10^7 pro Gefäß über Ficoll zentrifugiert. Die 4×10^9 nach der Zentrifugation übriggebliebenen KM-Zellen zeigten in der IF mit verschiedenen anti-T-Zell-Antikörpern keine T-Zellen mehr (nicht gezeigt). Eine erneute Rosettierung eines Aliquots mit 910-E zeigte noch eine Rosette unter 1000 KM-Zellen (Abb. 14b). Vor der Zentrifugation enthielt das KM 35 % T-Zellen (Abb. 14a), was auf Blutbeimengungen zurückzuführen sein dürfte.

Vier Wochen nach der Transplantation kam es bei dem Patienten zur hämatopoetischen Rekonstitution. Es bestand ein Chimärismus aus Empfänger- und Spender-Zellen. Zeichen einer GvH-Krankheit traten nicht auf. Der Patient hatte bei der Transplantation 8×10^7 Zellen/kg erhalten.

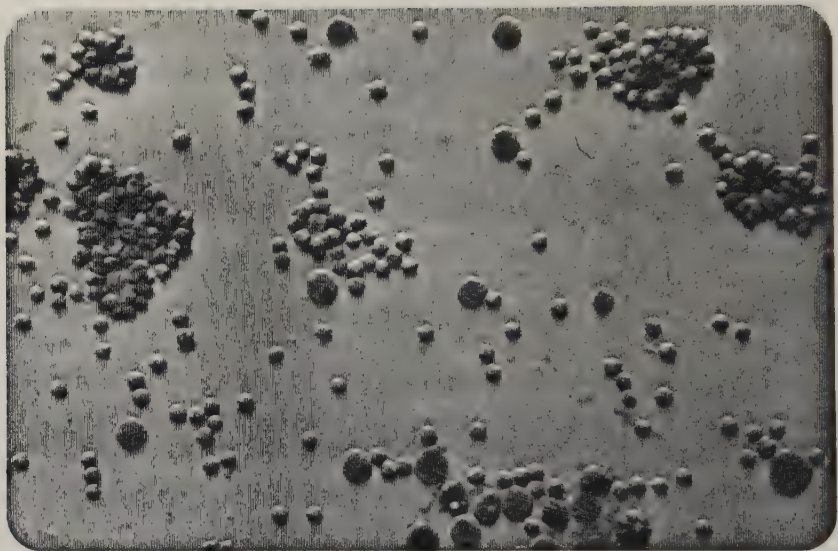


Abb. 14a: T-Zellen in KM vor Zentrifugation, rosettiert mit 910-E

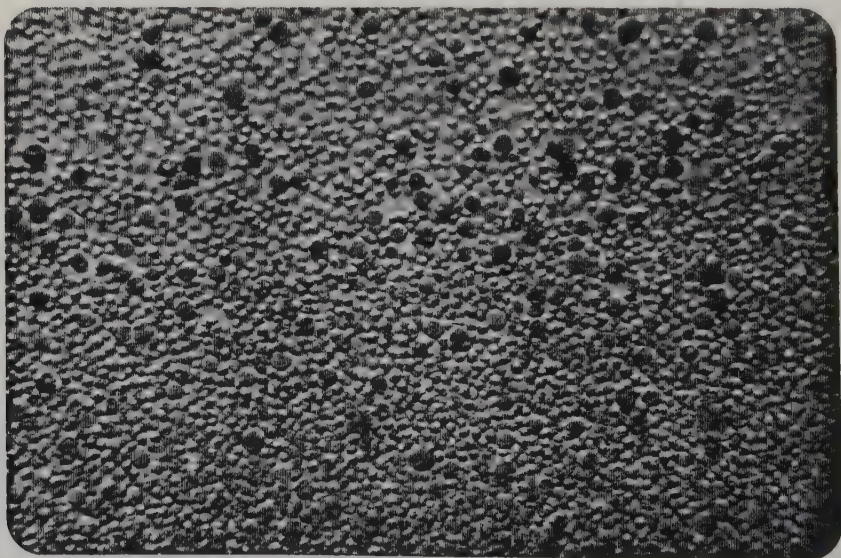


Abb. 14b: KM nach Zentrifugation und Rerosettierung mit 910-E

4. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde die direkte Rosettierungstechnik im Vergleich mit anderen Methoden hinsichtlich ihrer Sensibilität im Nachweis schwach exprimierter Antigene und ihrer Fähigkeit, Zellpopulationen in reiner Form aufzutrennen bzw. große Zellmengen von unerwünschten Zellen zu befreien, untersucht.

In früheren Versuchen war die hohe Empfindlichkeit der direkten Rosettierungsmethode beim Nachweis eines schwach exprimierten myelo-monozytären Antigens auf T-Zellen aufgefallen (Abb. 1, Ref. 60). Da eine direkte Rosettierung von PBL mit AK gegen das T4-Antigen, das bisher als T-Zellspezifisch angesehen wurde, auch zu einer Rosettenbildung mit Monozyten (MØ) führte, ergab sich die Frage, ob die gebildeten Rosetten wirklich über das T4-Antigen oder über Fc-Rezeptoren gebildet wurden. Aus mehreren Gründen war es notwendig, diese Frage an reinen MØ-Populationen zu untersuchen. Zum einen überwiegen in PBL-Präparationen, die mit anti-T4-konjugierten Erythrozyten rosettiert wurden, die T4-spezifischen T-Zell-Rosetten zahlenmäßig bei weitem. Zum anderen werden bei der Anfertigung von Zytozentrifugenpräparaten, die bei einer Anfärbung nach Pappenheim eine Unterscheidung rosettierter T-Lymphozyten und rosettierter MØ erlaubt, die Rosetten zum Teil zerstört, so daß eine prozentuale Auszählung rosettierter MØ zu ungenau wäre.

Reine MØ-Populationen (Abb. 3, Tab. 1) wurden durch eine direkte Rosettierung mit einem MAK gegen MØ (MAK M 42) und eine Zentrifugation über einen Percoll-Gradienten hoher Dichte gewonnen. Bei einer Percoll-Dichte von 1,085 g/ml lag die Reinheit der MØ bei 99 %, wie aus den nach Pappenheim gefärbten Zytozentrifugenpräparaten der ge-

reinigten MØ-Populationen ersichtlich ist (siehe Abb. 3). Bei niedrigerer Dichte des Gradienten war der Anteil kontaminierender Lymphozyten größer (Tab. 1). Vermutlich sedimentieren Rosetten bei einer Zentrifugation über einen Gradienten niedriger Dichte schneller und ziehen im Sinne einer Schlotwirkung hinter sich einige nicht rosettierte Zellen mit ins Sediment.

Die Isolierung von MØ durch den MAK M 42, der alle menschlichen, peripheren MØ erkennt (Rieber, persönliche Mitteilung), vermeidet eine Selektion einer MØ-Subpopulation, wie sie z.B. bei Isolierung von MØ über Plastikadhärenz stattfindet.

Mit Hilfe dieser reinen MØ-Populationen konnte nun die Spezifität der Rosettenbildung von anti-T4-konjugierten Erythrozyten mit MØ untersucht werden. Hierzu wurden $F(ab')_2$ -Fragmente eingesetzt. Weiterhin wurden zwei verschiedene anti-T4-AK, die verschiedene Epitope auf dem T4-Molekül erkennen (Rieber, persönliche Mitteilung) und verschiedene Isotypen besitzen, sowie zwei weitere Kontrollantikörper eingesetzt. Die Rosettierungen wurden mit den MØ verschiedener Spender und mit den Zellen verschiedener menschlicher Zelllinien durchgeführt (Tab. 2). Neben den Rosettierungen mit Erythrozyten, die mit verschiedenen MAK konjugiert worden waren (151-E, 151- $F(ab')_2$ -E, 310-E, 29-E, 811-E, s. Tab. 2a), wurden auch Inhibitionsversuche der Rosettenbildung mit 151-E durch Zugabe der gelösten MAK durchgeführt (Tab. 2b). Die Rosettenbildung war einerseits möglich, wenn $F(ab')_2$ -Fragmente des MAK T 151 auf Erythrozyten gebunden waren (Tab. 2a). Andererseits war die Rosettenbildung mit 151-E durch die Zugabe gelöster $F(ab')_2$ -Fragmente des MAK T 151 spezifisch inhibierbar (Tab. 2b).

Die durchgeführten Versuche zeigen deutlich, daß anti-T4-konjugierte Erythrozyten das T-Zell-Antigen T4 auf 40 bis 80 % der MØ in spezifischer Weise nachzuweisen erlauben (Tab. 2, Abb. 4-6).

Andere Untersucher konnten in jüngster Zeit ebenfalls die Anwesenheit des T4-Antigens auf MØ unter Verwendung verschiedener monoklonaler anti-T4-AK zeigen (70, 123). Diese Untersuchungen wurden mit dem FACS durchgeführt. Die untersuchten MØ wurden jedoch durch Plastikadhärenz gewonnen und zeigten nur eine ganz schwache Fluoreszenz, die kaum über dem "Background" lag und nach Aussage der Autoren von den meisten Untersuchern als negativ betrachtet worden wäre. Die hier vorgestellte, direkte Rosettierungstechnik hingegen zeigte oft eine eindeutige Rosettenbildung von anti-T4-konjugierten Rindererythrozyten mit MØ, die sogar eine quantitative Auszählung der rosettenbildenden MØ erlaubte. In den erwähnten Untersuchungen (70, 123) wurde ähnlich wie in den hier vorgestellten Ergebnissen eine starke Membran-Expression des T4-Moleküls auf der MØ-Linie U 937 festgestellt, was zeigt, daß histo-monozytäre Zellen prinzipiell in der Lage sind, T-Zell-typische Antigene zu synthetisieren.

Die hohe Nachweisempfindlichkeit der direkten Rosettierungstechnik könnte durch die hohe Anpassungsfähigkeit lebender Membranen, die einen großflächigen Kontakt benachbarter Membranen mit vielen Haftungsstellen erlaubt, sowie durch eine "Konzentrierung" von Antigen-Antikörper-Komplexen an den Kontaktstellen infolge der lateralen Beweglichkeit von Proteinen in lebenden Membranen, bedingt sein.

Eine heterotope Expression von T-Zell-Antigenen wurde mehrfach beschrieben. So wurde der Interleukin-2-Rezep-

tor, der ursprünglich nur auf T-Zellen gefunden worden war, später auf aktivierten B-Zellen nachgewiesen (122). Es wurde gezeigt, daß Interleukin-2 über diesen Rezeptor die Proliferationsfähigkeit aktivierter B-Zellen steigert (128). Verschiedene pan-T-Antigene werden auch von B-Zellen exprimiert. Das frühe B-Zell-Antigen CALLA wird auch auf Granulozyten gefunden (14, eigene Beobachtungen) und die Antigene T4 und T6 werden sogar außerhalb der hämatopoetischen Zellreihen auf Langerhansschen Zellen exprimiert (123).

Das T4-Antigen nimmt unter den heterotop exprimierten T-Zell-Antigenen eine besondere Stellung ein, weil dieses Antigen bevorzugt auf T-Zellen des Helfer/Inducer-Typs vorkommt und somit mit bekannten Funktionen assoziiert ist (27, 28, 32, 34, 65, 83, 89, 90, 118, 119). Die Korrelation zwischen Helfer/Inducer-Funktion und Expression des T4-Antigens ist jedoch nicht absolut. So existieren T-Zell-Klone, die das T4-Molekül exprimieren und die Eigenschaft von Suppressorzellen oder zytotoxischen Zellen (gegen class II-exprimierende Zellen) haben (5, 29, 66, 68). Verschiedene Untersucher konnten wahrscheinlich machen, daß das T4-Molekül auf zytotoxischen Zellen nur als assoziatives Element bei der Stabilisierung der Bindung zwischen Antigen/MHC-Genprodukt und T-Zell-Rezeptor dient. Bei hochaffinen T-Zell-Rezeptoren scheint das T4-Molekül entbehrlich zu sein. Möglicherweise erkennt das T4-Molekül eine monomorphe Determinante eines MHC(class II)-Antigens und trägt so zur Stabilisierung einer schwachen Bindung zwischen Antigen/MHC und Rezeptor bei (62, 64, 87).

Nicht auszuschließen ist, daß das T4-Antigen z.B. durch die Interaktion mit class II-Molekülen der MØ-Oberfläche an die Membran adsorbiert oder in sie eingefügt wurde.

Diese Möglichkeit könnte mit Hilfe von Translationshemmern oder durch den Nachweis von T4-spezifischer mRNA in MØ weiter untersucht werden. Solche Untersuchungen wurden in dieser Arbeit jedoch nicht in Angriff genommen. Die Beobachtung, daß die histiozytäre/monozytäre Zelllinie U 937 das T4-Antigen in starkem Maße exprimiert, weist darauf hin, daß Zellen der monozytären Differenzierungslineie in der Tat in der Lage sind, das T4-Antigen zu exprimieren. Die Beobachtung, daß das Antigen T8 auf MØ nicht nachweisbar ist, spricht gegen eine bloße Adsorption des T4-Moleküls an MØ. Im übrigen könnte auch ein adsorbiertes T4-Molekül eine funktionelle Bedeutung bei Zellinteraktionen haben.

Nachdem es gelungen war, das T4-Antigen außer auf vielen T-Zellen auch auf der monozytären Zelllinie U 937 und auf 40 bis 80 % der menschlichen Blutmonozyten spezifisch nachzuweisen, stellte sich die Frage, ob durch die Präsenz oder das Fehlen des T4-Antigens funktionell unterschiedliche MØ-Populationen definiert werden. Mit Hilfe der direkten Rosettierungstechnik wurde daher versucht, die MØ in T4-positive und T4-negative Populationen aufzutrennen. Anschließend sollten die aufgetrennten Populationen in verschiedenen Funktionstests miteinander verglichen werden. Als Testsysteme wurden MØ-abhängige Proliferationstests für autologe oder allogene T-Zellen gewählt. Die genauen Funktionen von MØ in diesen Testsystemen sind im einzelnen nicht bekannt, es könnte sich aber sowohl um die Prozessierung und Präsentation von löslichem Antigen oder Alloantigen für T-Zellen (2, 17, 78, 100, 103, 105) als auch um die Freisetzung von Faktoren wie z.B. IL-1 (Interleukin-1) (11, 63) handeln.

Für diese Versuche wurden T4-positive und T4-negative MØ durch eine Zentrifugation über einen Ficoll-Gradienten

aufgetrennt. Die T4-negative Population ließ sich nicht in ganz reiner Form gewinnen (90 bis 95 %), da die Rosetten bei den MØ mit nur sehr geringer Antigendichte nicht so stabil waren, daß sie die bei der Zentrifugation auftretenden Beschleunigungs- und Scherkräfte überlebten. Die Neigung der MØ zur Aggregatbildung verhinderte die Präparation einer ganz reinen T4-positiven Population.

Mit den aufgetrennten Populationen wurden verschiedene Proliferationstests durchgeführt. So wurde die Rolle T4-negativer und T4-positiver MØ bei der Stimulation autologer T-Zellen mit PHA (Abb. 8) und löslichem Antigen (Abb. 9) und bei der Stimulation allogener T-Zellen durch Alloantigen (Abb. 10) untersucht. In keinem Falle konnten überzeugende Proliferations-Unterschiede in Abhängigkeit von den verschiedenen MØ-Populationen gefunden werden. Bei Titration der MØ traten auch keine Unterschiede in den Proliferationstests auf, so daß ein Einfluß der jeweils kontaminierenden MØ unwahrscheinlich war. Das T4-Molekül auf MØ scheint somit keinen Einfluß auf die in diesen Versuchen untersuchten Zellinteraktionen zu haben.

Von manchen Autoren wurde eine Interaktion von MØ- und B-Zellen über lösliche Faktoren gezeigt (13, 26, 44). Zusätzlich könnte eine Interaktion in ähnlicher Weise wie zwischen MØ- und T-Zellen über eine Bindung von T4-Molekülen auf MØ an class II-Moleküle auf B-Zellen erfolgen. Da die Proliferationstests jedoch keine funktionellen Unterschiede zwischen den aufgetrennten MØ vermuten ließen, wurde auf eine Untersuchung dieser Populationen in dem komplizierteren System einer MØ-abhängigen Immunglobulinsynthese in vitro verzichtet.

Die bisherigen Daten deuten darauf hin, daß die Funkti-

onen der isolierten MØ- und T-Zellen durch das Verfahren der direkten Rosettierung nicht beeinträchtigt wurden. Um in einem weiteren unabhängigen Funktionstest zu zeigen, daß die direkte Rosettierungsmethode ein schonendes Trennverfahren darstellt, wurden isolierte B-Zellen und aufgetrennte T-Zell-Subpopulationen auf die sehr störanfällige Induktion einer antigenspezifischen Antikörperbildung in vitro untersucht (Abb. 11) (vgl. Ref. 8, 9, 22, 31, 35, 43, 106, 111, 112, 113).

Nach Impfung eines Spenders mit Tetanus-Toxoid (TT) war in einem Zeitraum von ein bis vier Wochen mit angereicherten B-Zellen und isolierten T-Zellen eine antigenspezifische, antigenabhängige in vitro Antwort induzierbar. Nach Entfernung der T8-positiven Zellen führte die Zugabe geringer Mengen T8-depletierter Zellen zu autologen B-Zellen zu einer starken Zunahme der antigenspezifischen und der polyklonalen Immunglobulinsekretion. Bei Zugabe größerer Mengen der T8-depletierten Zellen bzw. T-Zellen war der Effekt einer T8-Elimination - vermutlich wegen des Überwiegens von T-Helfer-Zellen in der nicht aufgetrennten T-Zell-Population - weniger ausgeprägt. Nebenbei wurde beobachtet, daß nicht adhärente Lymphozyten (NAL, Entfernung eines Teiles der MØ durch Adhärenz) im Vergleich mit PBL häufig eine höhere spezifische und polyklonale Sekretion aufwiesen (vgl. 50). Hierfür könnte die Entfernung inhibitorischer MØ (50), die Sekretion aktivierender Faktoren durch nicht adhärente MØ oder die Entfernung von Thrombozyten verantwortlich sein.

Auch in diesem empfindlichen Testsystem für die Induktion und Sekretion antigenspezifischer AK in Abwesenheit polyklonaler Aktivatoren ließ sich somit zeigen, daß das di-

rekte Rosettierungsverfahren antigenspezifische Zellen nicht schädigt und darüber hinaus die Untersuchung regulatorisch wirkender T-Zell-Subpopulationen ermöglicht. Der Nachweis der funktionellen Integrität antigenspezifischer B-Zellen nach einer T-Zell-Depletion könnte in Zukunft bedeutsam sein bei Versuchen, mit den in den nächsten Abschnitten beschriebenen Knochenmarktransplantationen auch eine spezifische Immunität des Transplantat-Spenders auf den Empfänger mit zu übertragen.

Da sich die direkte Rosettierung in Laborversuchen als sensible, schnelle, schonende und effektive Methode für die Entfernung von Zellen erwiesen hatte, wurde ihre Eignung für die Elimination von Zellen in großem Maßstabe bei autologen und allogenen Knochenmarktransplantationen (KMT) untersucht.

An verschiedenen hämatologischen Zentren wurden autologe Transplantationen nach vorheriger Entfernung leukämischer Zellen aus dem KM mit Hilfe monoklonaler Antikörper durchgeführt (96, 101). Die autologe Transplantation wurde auch bei der Behandlung solider Tumoren eingesetzt (20, 79, 102, 109, 110). Hierbei wurde autologes KM vor der Zerstörung des Tumors durch eine hochdosierte zytostatische Therapie oder Bestrahlung, die auch das KM zerstörte, entnommen und anschließend retransplantiert. Im KM möglicherweise vorhandene Metastasen könnten durch tumorspezifische MAK vor der Transplantation aus dem Mark entfernt werden.

Ein weiteres Anwendungsgebiet der KMT ist die allogene KMT, die in den letzten Jahren für die Behandlung verschiedener angeborener und erworbener Erkrankungen des

blutbildenden Systems zunehmend eingesetzt wurde (72). Allogene KMT kamen zur Anwendung bei aplastischen Anämien (11, 12, 19), Leukämien (47, 115, 117), bei verschiedenen Formen der Immundefizienz wie SCID (Severe Combined Immunodeficiency (6)) und anderen hämatologischen Erkrankungen (3, 77), z.B. Thalassämien (116), Fanconi's Anämie (36), Myelofibrosen und Myelopetrosen (107, 108). Auch bei verschiedenen nicht hämatologischen Enzym-Defekt-Zuständen (Mucopolysaccharidosen, M. Gaucher) wurden KMT zur Behebung des Enzymmangels im Blut angewendet (41, 42, 54, 81).

In den meisten Fällen von KMT wurde KM von HLA-identischen Geschwistern des Patienten verwendet. Dennoch kam es in 30 bis 70 % der HLA-identischen KMT zu einer akuten GVH (Graft-Versus-Host)-Erkrankung, die direkt oder indirekt zum Tode von 20 bis 40 % der betroffenen Patienten führt (72). In Tierexperimenten wurde wahrscheinlich gemacht, daß alloreaktive Spender-T-Zellen, die gegen MHC-Antigene und Antigene außerhalb des MHC-Komplexes reagieren, für eine GVH-Erkrankung verantwortlich sind (37, 98, 99). Bei der akuten GVH-Krankheit treten oft schwere Infektionen (z.B. Zytomegalie, Herpesvirus, Pneumocystis carinii, Candida albicans) auf (67, 75), die durch die GVH-Erkrankung selber aktiviert oder indirekt durch eine Immun-Suppression bei Vermehrung der T-Zellen vom suppressiven/zytotoxischen Typ begünstigt sein könnten (15, 30, 71, 91).

Daher scheint es notwendig zu sein, alloreaktive T-Zellen aus KM vor der Transplantation zu entfernen. Einerseits könnten schwere GVH-Erkrankungen bei HLA-identischen Transplantationen mit KM von verwandten oder nicht-verwandten Spendern wahrscheinlich vermieden werden. Andererseits könnten voll-allogene Transplantationen oder

haploidentische Eltern-Kind-Transplantationen ohne erhöhtes Risiko einer letalen GVH-Erkrankung durchgeführt werden. Für viele Patienten mit wenigen oder keinen Geschwistern stehen nur allogene Spender bzw. haploidentische Eltern zur Verfügung. Aufgrund von Tierversuchen muß allerdings befürchtet werden, daß bei voll-allogenen Transplantationen die funktionelle immunologische Rekonstruktion unvollständig ist (55, 127), während bei haploidentischen Eltern-Kind-Transplantationen die MHC-Übereinstimmungen für eine immunologische Rekonstitution ausreichend zu sein scheinen (73, 82, 92, 93, 126). Transplantationsversuche mit voll-allogener, fötaler Leber bei Patienten mit Aplasie oder Leukämie führten zu keiner überzeugenden immunologischen Rekonstitution (61, 74, 104).

Es ist denkbar, daß ohne manifeste oder subklinische GVH-Reaktion nach völliger Depletion der Spender-T-Zellen eine HvG-Reaktion (Host-versus-Graft) zur Abstoßung des Transplantates führen könnte. Auch könnte der postulierte antileukämische Effekt einer GVH-Erkrankung ausfallen. Beide Probleme sind jedoch bisher nicht geklärt.

Bisher wurden verschiedene Techniken zur Entfernung von T-Zellen im Tiermodell oder beim Menschen *in vitro* oder *in vivo* angewandt (39, 40, 53, 80, 97). Von verschiedenen Untersuchern wurde z.B. versucht, T-Zellen aus menschlichen KM durch Besetzung der Zelloberflächen mit Anti-T-Zell-Globulin oder monoklonalen Anti-T-Zell-AK und anschließender Komplement-Lyse oder Phagozytose *in vivo* zu eliminieren (24, 25, 80, 97). Da jedoch die *in vivo* Elimination opsonisierter T-Zellen schlecht überprüft werden kann und Phänomene wie die "Modulation" von Antigenen das Überleben allogener T-Zellen im Empfänger ermöglichen könnten, wäre eine Elimination von T-Zellen

in vitro wünschenswert. Für die in vitro-Elimination von allogenen T-Zellen wurden beim Menschen mit Erfolg im wesentlichen zwei Verfahren angewandt. Einerseits wurden T-Zellen in einem außerordentlich aufwendigen Verfahren durch die Kombination einer Bindung an Lektine und einer Rosettierung mit Schafserythrozyten eliminiert (40, 48, 73, 92, 93) und andererseits wurde für die Elimination von T-Zellen eine mehrfache Inkubation des KM mit monoklonalen Anti-T-Zell-AK und Komplement durchgeführt (39, 82).

Da es für eine vollständige Entfernung unerwünschter Zellen wichtig ist, auch Zellen mit geringer Antigendichte zu erfassen, schien die direkte Rosettierung mit MAK in Verbindung mit den gezeigten guten Depletionsergebnissen und der einfachen Durchführung auch für den Einsatz bei KMT besonders geeignet zu sein. Sie mußte jedoch mit den bereits erwähnten Verfahren der Komplement-Lyse und der Rosettierung mit Schafserythrozyten in ihrer Effizienz und Unschädlichkeit verglichen werden. Offensichtliche Nachteile der Komplement-Lyse sind die Tatsache, daß MAK nur einiger Isotypen (IgG 2; IgM) zur komplementvermittelten Lyse fähig sind.

In mehreren in dieser Arbeit vorgestellten Versuchen wurde die direkte Rosettierung mit der Komplement-Lyse bei der Elimination von T-Zellen und leukämischen (cALLA-positiven) Zellen verglichen. Es zeigte sich, daß die direkte Rosettierung unabhängig von der Antigendichte immer eine vollständigere Elimination von Zellen erlaubte als die Komplement-Lyse. Die Komplement-Lyse kam nur bei hoher Antigendichte in ihrer Effizienz der direkten Rosettierungsmethode nahe (Tab. 3-5). Auch von anderen Untersuchern war in anderem Zusammenhang gezeigt worden, daß für die Komplement-Lyse eine bestimmte Antigen-Dichte nötig ist (58). So blieben bei Verwendung verschiedener

anti-T-Zell-AK bei der Komplement-Lyse noch 5 % der T-Zellen übrig (38).

Ein Nachteil der direkten Rosettierungsmethode ist, daß bei dem Konjugationsverfahren mit CrCl_3 relativ große Mengen und hohe Konzentrationen von MAK benötigt werden. Bei der indirekten Rosettierung hingegen werden geringere Mengen von MAK benötigt, da die Zellen zuerst mit vergleichsweise geringen Konzentrationen von MAK und dann mit Anti-Serum konjugierten Erythrozyten inkubiert werden. Bei dem vorgestellten (Abb. 12) Vergleich der Rosettenstabilität direkter und indirekter Rosetten erwiesen sich jedoch die direkten Rosetten als wesentlich stabiler. Außerdem ist das indirekte Rosettierungsverfahren, bei dem der MAK wieder durch mehrfaches Waschen entfernt werden muß, wegen der vielen Wasch- und Inkubationsschritte zu umständlich, zu zeitraubend und zu unsicher.

Eine andere Methode zur Entfernung von T-Zellen aus KM ist die Rosettierung mit Schafserythrozyten (SE). Jedoch waren auch diese Rosetten mit und ohne Stabilisierung durch AET bei mechanischer Belastung weniger stabil als direkte Rosetten mit einem MAK gegen den Schafserythrozyten-Rezeptor (Abb. 13). Möglicherweise ist die Zahl direkt konjugierter AK-Moleküle auf Erythrozytenoberflächen viel größer als die Zahl natürlicherweise auf Schafserythrozyten vorkommender Moleküle, die vom SE-Rezeptor erkannt werden. Auch kann man einen MAK hinsichtlich hoher Affinität zu seinem Antigen auswählen.

Eine Voraussetzung für die Anwendbarkeit der direkten Rosettierung bei KMT ist, daß Stammzellen durch das Verfahren nicht geschädigt oder eliminiert werden. Eine Schädigung oder Elimination könnte durch die Manipulationen während der Rosettierung oder bei der Zentrifuga-

tion oder auch durch das Erkennen eines Oberflächenantigens der Stammzellen durch den verwendeten MAK erfolgen Tab. 6 (durchgeführt in Zusammenarbeit mit Prof. Haas, Universitätskinderklinik München) zeigt, daß differentiationsfähige Stammzellen in dem depletierten KM nach direkter Rosettierung mit MAK angereichert waren.

Die direkte Rosettierungstechnik wurde inzwischen bei einer allogenen KMT angewendet. KM der HLA-identischen Schwester eines Patienten mit AML in erster Remission wurde durch eine einzige direkte Rosettierung mit MAK T 910 und eine Zentrifugation über Ficoll von T-Lymphozyten befreit. Das KM enthielt vor der Elimination 35 % T-Zellen. Nach der Elimination lag der Anteil kontaminierender T-Zellen unter 1:1000 (Abb. 14). Vor der Transplantation wurde der Empfänger mit Endoxan und einer fraktionierten Bestrahlung (total 1100 Rad) zur Suppression der eigenen Lymphopoiese behandelt. Vier Wochen nach der Transplantation kam es zur hämatologischen Rekonstitution. Der Patient trug nun die Blutgruppenantigene seiner Schwester. PHA-stimulierte Lymphoblasten seines peripheren Blutes zeigten in der Chromosomenanalyse (freundlicherweise durchgeführt von Dr. Walther, Kinderpoliklinik der Universität München) neben Zellen des Empfängers (xy) auch Zellen des Spenders (xx). Offenbar waren die Chemotherapie und Bestrahlung des Empfängers vor der Transplantation nicht in der Lage gewesen, alle Empfänger-Lymphozyten (möglicherweise langlebige Gedächtniszellen, die die Konditionierung überlebten) zu zerstören. Das Vorhandensein von Spender-Zellen und der Wechsel der Blutgruppenantigene beweisen, daß Stammzellen erfolgreich transplantiert wurden, die zur hämatopoietischen Rekonstitution in der Lage waren. Bislang (4 Monate) traten keine Zeichen einer GvH-Krankheit auf. Es sind allerdings mehrere Transplantationen nötig, um zu

zeigen, daß durch eine Elimination von T-Zellen mit der direkten Rosettierungsmethode eine GvH-Krankheit sicher vermieden werden kann.

Wegen ihrer hohen Effizienz kann die direkte Rosettierungstechnik auch bei autologen Transplantationen in Fällen von Leukämien, gegen die monoklonale Antikörper zur Verfügung stehen, in Zukunft eingesetzt werden.

Danksagung

Ich danke folgenden Mitgliedern des Instituts für Immunologie für ihre Unterstützung:

Dr. Martin Wilhelm, Eugen Kopp, Gerti Rank, Simone Bach sowie den Herren Professoren Dr. E.P. Rieber und Dr. G. Riethmüller.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe monoklonaler Antikörper gegen Oberflächenantigene von Lymphozyten können verschiedene Lymphozytenpopulationen definiert werden. Will man diese Zellen auf ihre immunologischen Funktionen untersuchen, ist es nötig, gereinigte Populationen herzustellen. Vielfach werden hierfür indirekte Rosettierungsmethoden oder automatisierte Cell-Sorter (FACS) verwendet. In dieser Arbeit wurde eine direkte Rosettierungsmethode ausgearbeitet, die es erlaubt, sehr schwach exprimierte Oberflächenantigene auf Monozyten nachzuweisen, die in der konventionellen Immunfluoreszenz kaum sichtbar sind. Außerdem war es möglich, mit dieser Methode große Zellmengen schnell und schonend in sehr reine Populationen aufzutrennen. Mit der direkten Rosettierungsmethode war es nicht nur möglich, das T-Zell-Antigen T4 auf menschlichen Monozyten in geringer Dichte nachzuweisen, sondern es gelang auch, Monozyten in T4-positive und T4-negative Fraktionen aufzutrennen und in verschiedenen Verfahren funktionell zu vergleichen. Beide Monozytenpopulationen zeigten keine Unterschiede in ihrer Fähigkeit, lösliches Antigen gereinigten, autologen T-Zellen zu präsentieren oder eine Mitogen-induzierte T-Zell-Proliferation zu unterstützen. Beide Populationen waren in der Lage, allogene T-Zellen zu stimulieren.

Die direkte Rosettierungsmethode empfiehlt sich auch für die quantitative Elimination von unerwünschten Zellen. Dies konnte einerseits in Laborversuchen gezeigt werden, in denen der Einfluß verschiedener T-Zell-Subpopulationen auf die antigenspezifische und polyklonale Immunglobulinsynthese von angereicherten B-Lymphozyten in vitro untersucht wurde. Zum anderen ließen sich mit dieser Technik

T-Zellen in großem Maßstabe aus allogenen Knochenmark vor der Transplantation radikal entfernen, wobei die Fähigkeit von Stammzellen zur terminalen Differentiation erhalten blieb. Auch leukämische Zellen können mit dieser Methode aus autologem Mark quantitativ entfernt werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Anderson, K.C., Griffin, J.D., Bates, M.P.,
Slaughenhaupt, B.L., Schlossman, S.F., Nadler, L.M.
(1983) J.Imm.Methods 61,283
- (2) Arala-Chaves, M.P., Hope, L., Korn, J.H. Fudenberg, H.
(1978) Eur.J.Immunol. 8,77
- (3) August, C.S., King, E., Githens, J.H., McIntosh, K.,
Humbert, J.R., Greensheer, A., Johnson, F.B.
(1976) Blood 48,491
- (4) Beckmann, E., Levitt, D.
(1984) Scand.J.Immunol. 19/1
- (5) Biddison, W.E., Rao, P.E., Talle, M.A., Goldstein,
G., Shaw, S.
(1982) J.Exp.Med. 156,1065
- (6) Bortin, M., Rimm, A.
(1977) JAMA 238,591
- (7) Brenner, M.K., Newton, C.A., North, M., Weymann, C.,
Farrant, J.
(1983) Immunology 50,377
- (8) Callard, E.R.
(1979) Nature 282,734
- (9) Callard, E.R., McCaughan, G.W., Babbage, J.,
Souhami, R.L.
(1982) J.Immunol. 129,153

- (10) Callard, R.E., Smith, C.M., Beverly, P.C.L.
(1982) Eur.J.Immunol. 12,232
- (11) Camitta, B.M., Storb, B., Thomas, E.D.
(1982) N.Engl.J.Med. 306,712
- (12) Camitta, B.M., Thomas, E.D., Nathan, D.G., Gale,
R.P., Kopecky, J., Rapoport, J.M.
(1979) Blood 53,50
- (13) Corbel, C., Melchers, F.
(1983) Eur.J.Immunol. 13,528
- (14) Cossman, J., Neckers, L.M., Leonard, W.J.,
Greene, W.C.
(1983) J.Exp.Med. 157,1064
- (15) de Bruin, H.G., Astaldi, A., Leupers, T., van de
Griend, R.J., Dooren, L.J., Schellekens, P.T.A.,
Tanke, H.J., Roos, M., Vossen, J.M.
(1981) J.Immunol. 127,244
- (16) DeFreitas, E.C., Chesnut, R.W., Grey, H.W.,
Chiller, J.M.
(1983) J.Immunol. 131,23
- (17) de Vries, J.E., Caviles, A.P., Bont, W.S.,
Mendelsohn, J.
(1979) J. Immunol. 122,1099
- (18) Dialynas, D.P., Quan, Z.S., Wall, K.A., Pierres, A.,
Quintans, J., Loken, M.R., Pierres, M., Fitch, F.W.
(1983) J.Immunol. 131,2445
- (19) Dupont, B., Flomenberg, N., O'Reilly, R.J.
(1981) Ann.Clin.Res. 13,358

- (20) Douer, D., Champlin, R.E., Ho, W.G., Sarna, G.P.,
Wells, J.H., Graze, P.R., Cline, M.J., Gale, R.P.
(1981) Am.J.Med. 71,973
- (21) Egeland, T., Lea, T.
(1982) J.Imm.Methods 55,213
- (22) Ershler, W.B., Moore, A.L., Hacker, M.P.
(1982) Clin.exp.Immunol. 49,552
- (23) Ertl, H.C.J., Homans, E., Tournas, S., Finberg, R.W.
(1984) J.Exp.Med. 159, 1778
- (24) Filipovich, A.H., McGlave, P.B., Ramsay, N.K.C.,
Goldstein, G., Warkentin, P.I., Kersey, J.H.
(1982) Lancet 1,1266
- (25) Filipovich, A.H., Ramsay, N.K.C., Warkentin, P.I.,
McGlave, P.B., Goldstein, G., Kersey, J.H.
(1982) Lancet, June 5,1266
- (26) Finelt, M., Hoffmann, M.K.
(1979) Clin.Immunol.Immunopath. 12,281
- (27) Fischer, A., Beverly, P.C.L., Feldmann, M.
(1981) Nature 294,166
- (28) Fischer, A., Nash, S., Beverly, P.C.L., Feldmann, M.
(1982) Eur.J.Immunol. 12, 844
- (29) Flomenberg, N., Naito, K., Duffy, E., Knowles, R.W.,
Evans, R.L., Dupont, B.
(1983) Eur.J.Immunol. 13,905
- (30) Friedrich, W., O'Reilly, R.J., Koziner, B., Geb-
hard, D., Good, R.A., Evans, R.L.
(1982) Blood 59,696

- (31) Galanaud, P.
(1979) Imm.Rev. 45,141
- (32) Gatenby, P.A., Kansas, G.S., Xian, C.Y., Evans,
R.L., Engeleman, E.G.
(1982) J.Immunol. 129,1997
- (33) Gatenby, P.A., Kotzin, B.L., Engelman, E.G.
(1981) J.Immunol. 127,2130
- (34) Gatenby, P.A., Kotzin, B.L., Kansas, G.S., Engle-
man, E.G.
(1982) J.Exp.Med. 156,55
- (35) Geha, R.S., Mudawwar, F., Schneeberger, E.
(1977) J.Exp.Med. 145,1436
- (36) Gluckman, E., Devergie, A., Schaison, G., Bussel, A.,
Berger, R., Sohier, J., Bernard, J.
(1980) Br.J.Haematol. 45,557
- (37) Good, R.A.
(1982) N.Engl.J.Med. 306,421
- (38) Granger, S., Janossy, G., Francis, G., Blacklock,
H., Poulter, L.W., Hoffbrand, A.V.
(1982) Br.J.Haematol. 50,367
- (39) Hale, G., Bright, S., Chumbley, G., Hoang, T., Met-
calf, D., Munro, A.J., Waldmann, H.
(1983) Blood 62,873
- (40) Hayward, A.R., Murphy, J., Githen, J., Troup, G.,
Ambroso, D.
(1982) J.Pediatr. 100,665

- (41) Hobbs, J.R.
(1981) Lancet 2,735

- (42) Hobbs, J.R., Hugh-Jones, K., James, D.C.O., Barrett, A.J., Chambers, D., Selwyn, S., Lucas, C., Beilby, B., Watson, A.J., Patrick, A.D., Benson, P.D.
(1982) Exp.Hematol. 10,48

- (43) Hoffmann, M.K.
(1980) PNAS 77,1139

- (44) Hoffmann, M.K., Koenig, S., Mittler, M.S., Oettgen, H.F., Ralph, P., Galanos, C., Hammerling, U.
(1979) J.Immunol. 122,497

- (45) Hokland, P., Rosenthal, P., Griffin, J.D., Nadler, L.M., Daley, J., Hokland, M., Schlossman, S.F., Ritz, J.
(1983) J.Exp.Med. 157,114

- (46) Indiveri, F., Wilson, B.S., Pellegrino, M.A., Ferrone, S.
(1979) J.Imm.Methods 29,101

- (47) Johnson, F.L., Thomas, E.D., Clark, B.S., Chard, R.L., Hartmann, J.R., Storb, R.
(1981) N.Engl.J.Med. 305,846

- (48) Kapoor, N., O'Reilly, R.J., Kirkpatrick, D., Pollack, M.S., Dupont, B., Good, R.A., Reisner, Y
(1982) Pediatr.Res. 16,224

- (49) Karavodin, L.M., Golub, S.H.
(1983) J.Imm.Methods 61,293

- (50) Knapp, W., Baumgartner, G.
(1978) J.Immunol. 121,1177
- (51) Köhler, G., Milstein, C.
(1975) Nature 256,495
- (52) Körbling, M., Hunstein, W., Flidner, T.M.
(1984) DMW 109,209
- (53) Kolb, H.J., Reider, I., Rodt, H., Netzel, B.,
Grosse-Wilde, H., Scholz, S., Schaffer, E., Kolb,
H., Thierfelder, S.
(1979) Transplantation 27,242
- (54) Krivit, W., Kersey, J., Pierpont, M.E., Tsai, M.,
Filopovich, L., Nesbit, M.E., Ramsay, N.K.C.,
Desnick, R.J.
(1982) Blood 60 (Suppl. 1),606
- (55) Krown, S.E., Coico, R., Scheid, M.P., Fernandes, G.,
Good, R.A.
(1980) Clin.Immunol.Immunopathol. 19,268
- (56) Lane, H.C., Volkmann, D.J., Whalen, G., Fauci, A.S.
(1981) J.Exp.Med. 154,1043
- (57) Ledbetter, J.A., Evans, R.L., Lipinski, M., Cunningham-Rundless, C., Good, R.A., Herzenberg, L.A.
(1981) J.Exp.Med. 153,310
- (58) Ledbetter, J.A., Rouse, R.V., Micklem, H.S.,
Herzenberg, L.A.
(1980) J.Exp.Med. 152,280
- (59) Ling, R., Richardson, P.R.
(1981) J.Imm.Methods 47,265

- (60) Lohmeyer, J., Rieber, P., Feucht, H., Johnson, J.,
Hadam, M., Riethmüller, G.
(1981) Eur.J.Immunol. 11,997
- (61) Lucarelli, G., Porcellini, A., Delfini, C., Polchi,
p., Moletti, L., Manna, A., Galli, G.
(1980) Excerpta Med. 514,284
- (62) MacDonald, H.R., Glasebrook, A.L., Bron, C.,
Kelso, A., Cerottini, J.C.
(1982) Immunol.Rev. 68,89
- (63) Maizel, A.L., Mehta, S.R., Ford, R.J., Lachman, L.B.
(1981) J.Immunol. 153,470
- (64) Marrack, P., Endres, R., Shimonkevitz, R., Zlotnik, A.,
Dialynas, D., Fitch, F., Kappler, J.
(1983) J.Exp.Med. 158,1077
- (65) Meuer, S.C., Cooper, O.A., Hodgdon, J.C., Hussey,
R.E., Morimoto, C., Schlossman, S.F., Reinherz, E.L.
(1983) J.Immunol. 131,1167
- (66) Meuer, S.C., Schlossman, S.F., Reinherz, E.L.
(1982) PNAS 79,4395
- (67) Meyers, J.D., McGuffin, R.W., Bryson, Y.J., Cantell,
K., Thomas, E.D.
(1982) J.Infect.D. 146,80
- (68) Mingari, M.C., Melioli, G., Moretta, A., Pantaleo, G.,
Moretta, L.
(1982) Eur.J.Immunol. 12,900
- (69) Morimoto, C., Distaso, J.A., Borell, Y., Schlossman,
S.F., Reinherz, E.L.
(1982) J.Immunol. 128, 1645

- (70) Moscicki, R.A., Amento, E.P., Krane, S.M., Kurnick, J.T., Colvin, R.B.
(1983) J.Immunol. 131,743
- (71) Olding, L.B., Jensen, F.C., Oldstone, M.B.A.
(1975) J.Exp.Med. 141,561
- (72) O'Reilly, R.J.
(1983) Blood 62,941
- (73) O'Reilly, R.J., Kirkpatrick, D., Cunningham-Rundles, S., Pollack, M.S., Dupont, B., Hodes, M.Z., Good, R.A., Reisner, Y.
(1983) Transplant.Proc. 15,1431
- (74) O'Reilly, R.J., Pahwa, R., Kagan, W., Kapoor, N., Sorell, M., Meyers, R., Good, R.A.
(1977) Exp.Hematol. 5 (Suppl.2),46
- (75) O'Reilly, R.J., Reich, L., Gold, J., Kirkpatrick, D., Dinsmore, R., Kapoor, N., Condie, R.
(1983) Transplant.Proc. 15,1405
- (76) Parish, C.R., McKenzie, J.
(1978) J.Imm.Methods 20,173
- (77) Parkman, R., Rapoport, J., Geha, R., Belli, J., Cassady, R., Levy, R., Nathan, D.G., Rosen, F.S.
(1978) N.Engl.J.Med. 298,921
- (78) Pettinelli, C.B., Ahmann, G.B., Shearer, G.M.
(1980) J.Immunol. 124,1911
- (79) Phillips, G.L., Fay, J.W., Herzig, G.P., Herzig, R.H., Weiner, R.S., Wolff, S.N., Lazarus, H.M., Karanes, C., Ross, W.E., Kramer, B.S.
(1983) Cancer 52,1792

- (80) Prentice, H.G., Blacklock, H.A., Janossy, G., Bradstock, K.F., Skeggs, D., Goldstein, G., Hoffbrand, A.V.
(1982) Lancet 1,700 .
- (81) Rappeport, J., Brady, R.O., Rosen, F.S., Nathan, D.G., Parkman, R., Barranger, J.A.
(1982) Blood 60 (Suppl. 1),599
- (82) Reinherz, E.L., Geha, R., Rappeport, J.M., Wilson, M., Penta, A.C., Hussey, R.E., Fitzgerald, K.A., Daley, J.F., Levine, H., Rosen, F.S., Schlossman, S.F.
(1982) PNAS 79,6047
- (83) Reinherz, E.L., Kung, P.C., Breard, J.M., Goldstein, G., Schlossman, S.F.
(1980) J.Immunol. 124,1883
- (84) Reinherz, E.L., Kung, P.C., Goldstein, G., Levey, R.H., Schlossman, S.F.
(1980) PNAS 77,1588
- (85) Reinherz, E.L., Kung, P.C., Goldstein, G., Schlossman, S.F.
(1979) J.Immunol. 123,1312
- (86) Reinherz, E.L., Kung, P.C., Goldstein, G., Schlossman, S.F.
(1980) J.Immunol. 124,1301
- (87) Reinherz, E.L., Meuer, S.C., Schlossman, S.F.
(1983) Immunol.Rev. 74,83

- (88) Reinherz, E.L., Morimoti, C., Fitzgerald, K.A.,
Hussey, R.E., Daley, J.F., Schlossman, S.F.
(1982) J.Immunol. 128,463

- (89) Reinherz, E.L., Morimoto, C., Penta, A.C., Schloss-
man, S.F.
(1980) Eur.J.Immunol. 10,570

- (90) Reinherz, E.L., Morimoto, C., Penta, A.C., Schloss-
man, S.F.
(1981) J.Immunol. 126,67

- (91) Reinherz, E.L., Ronertson, P., Rapoport, J.,
Rosen, F.S., Schlossman, S.F.
(1979) N.Engl.J.Med. 300,1061

- (92) Reisner, Y., Kapoor, N., Kirkpatrick, D., Pollack,
M.S., Dupont, B., Good, R.A., O'Reilly, R.J.
(1981) Lancet 2,327

- (93) Reisner, Y., Kapoor, N., Kirkpatrick, D., Pollack,
M.S., Cunningham-Rundles, S., Dupont, B., Hodes,
M.Z., Good, R.A., O'Reilly, R.J.
(1983) Blood 61,341

- (94) Rieber, P., Lohmeyer, J., Schendel, D.J., Rieth-
müller, G.
(1981) Hybridoma 1,59

- (95) Ritz, J., Bast, R.C., Clavell, L.A., Hercend, T.,
Sallan, S.E., Lipton, J.M., Feeney, M., Nathan, D.G.,
Schlossman, S.F.
(1982) Lancet, July 10,60

- (96) Ritz, J., Sallan, S.E., Bast, R.C., Lipton, J.M.,
Clavell, L.A., Feeney, M., Hercend, T., Nathan,
D.G., Schlossman, S.F.
(1982) Lancet 1,60
- (97) Rodt, H., Kolb, H.J., Netzel, B., Haas, R.J., Wilm,
K., Gotze, C.B., Link, H., Thierfelder, S.
(1981) Transplant.Proc. 13,257
- (98) Rodt, H., Kolb, H.J., Netzel, B., Rider, I., Janka,
G., Belohradsky, B., Haas, R.J., Thierfelder, S.
(1979) Transplant.Proc. 11,962
- (99) Rodt, H., Thierfelder, S., Eulitz, M.
(1974) Eur.J.Immunol. 4,25
- (100) Rosenstreich, D.L., Farrar, J.J., Daugherty, S.
(1976) J.Immunol. 116,131
- (101) Sallan, S., Bast, R., Lipton, J., Schlossman, S.F.,
Nathan, D., Ritz, J.
(1982) Blood 60 (Suppl. 1),172a
- (102) Schmaiser, T.
(1984) Blut 48,53
- (103) Schmidtke, J.R., Hatfield, S.
(1976) J.Immunol. 116,357
- (104) Scott, R.B., Matthias, J.Q., Costandoulakis, M.,
Kay, H.E.M., Lucas, P.F., Whiteside, J.D.
(1961) Br.Med.J. 2,1385
- (105) Singer, A., Kruisbeek, A.M., Andrysiak, P.M.
(1984) J.Immunol. 132,2199

- (106) Smith, C.M., Callard, R.E.
(1982) Eur.J.Immunol. 12,558
- (107) Smith, J.W., Shulman, H.M., Thomas, E.D., Fefer, A., Buckner, C.D.
(1981) Cancer 48,2198
- (108) Sorell, M., Kapoor, N., Kirkpatrick, D., Rosen, J.F., Chaganti, R.S.K., Lopez, C., Dupont, B., Pollack, M.S., Terrin, B.N., Harris, M.B., Vine, D., Rose, J.E., Goossen, C., Lane, J., Good, R.A., O'Reilly, R.J.
(1980) Am.J.Med. 302,701
- (109) Spitzer, G., Dicke, K.A., Litamin, J., Verma, D.S., Zander, A., Lanzotti, V., Valdivieso, M., McCredie, K.B., Samuels, M.L.
(1980) Cancer 45,3075
- (110) Spitzer, G., Farha, P., Valdivieso, M., Dicke, K.A., Zander, A., Dhingra, M., Minnhaar, G., Vellekoop, L., Verma, D.S., Umsawasdi, T., Chiuten, D.
(1982) Exp.Hemat. 10 (Suppl. 11),19
- (111) Stevens, R.H.
(1982) Imm.today 3/5,144
- (112) Stevens, R.H., Macy, E., Morrow, C., Saxon, A.
(1979) J.Immunol. 122,2498
- (113) Stevens, R.H., Thiele, C.J.
(1980) J.Immunol. 124,1898
- (114) Tax, W.J.M., Tidman, N., Janossy, G., Trejdosiewicz, L., Willems, R., Leeuwenberg, J., De Witte, T.J.M., Capel, P.J.A., Koene, R.A.P.
(1984) Clin.exp.Immunol. 55,427

- (115) Thomas, E.D., Buckner, C.D., Banaji, M., Clift, R.A., Fefer, A., Fluornoy, N., Goodell, B.W., Hickman, R.O., Lerner, K.G., Neiman, P.E., Sale, G.E., Sanders, G.E., Singer, J., Stevens, M., Storb, R., Weiden, P.L.
(1977) Blood 49,511
- (116) Thomas, E.D., Buckner, C.D., Sanders, J.E. Pappayannopoulou, T., Borgna-Pignatti, C., DeStefano, P., Sullivan, K.M., Clift, R.A., Storb, R.
(1982) Lancet 2,227
- (117) Thomas, E.D., Clift, R.A., Buckner, C.D.
(1982) Cancer Treat.Rep. 66,1463
- (118) Thomas, Y., Rogozinski, L., Irigoyen, O.H., Hedmann, S.E., Kung, P.C., Goldstein, G., Chess, L.
(1981) J.Exp.Med. 154,459
- (119) Triebel, F., Missenard-Leblond, V., Autran, B., Couty, M.C., Charron, D., Debre, P.
(1984) Eur.J.Immunol. 14,697
- (120) Volkmann, D.J., Allyn, S.P., Fauci, A.S.
(1981) J.Immunol. 129,107
- (121) Wagemaker, G., Vriesendorp, H.M., van Bekkum, D.W.
(1981) Transplant.Proc. 13,875
- (122) Waldmann, T.A., Goldman, C.K., Robb, R.J., Depper, J.M., Leonard, W.J., Sharrow, S.O., Bongiovanni, K.F., Korsmeyer, S.J., Greene, W.C.
(1984) J.Exp.Med. 160,1450
- (123) Wood, G.S., Warner, N.L., Warnke, R.A.
(1983) J.Immunol. 131,212

- (124) Wormmeester, J., Stiekema, F., De Groot, K.
(1984) J.Imm.Methods 67,389
- (125) Wysocki, L.J., Sato, V.L.
(1978) PNAS 75,2844
- (126) Zinkernagel, R.M., Althage, A., Callahan, G.,
Welsh, R.M.
(1980) J.Immunol. 124,6
- (127) Zinkernagel, R.M., Sado, T., Althage, A., Kamisaku, H.
(1984) Eur.J.Immunol. 14,14
- (128) Zubler, R.H., Lowenthal, J.W., Erard, F., Hashi-
moto, N., Devos, R., MacDonald, H.R.
(1984) J.Exp.Med. 160,1170

Lebenslauf

Name	Heinrich Pechumer
geboren	21.08.1953 in Aschaffenburg
1960-1964	Grundschule in Miltenberg
1964-1973	Gymnasium in Miltenberg
1973	Reifeprüfung
1974-1979	Studium der Medizin an der Universität Freiburg
1979-1980	Studium der Medizin an der Universität Ulm
1980	Staatsexamen in Medizin Approbation als Arzt
1981-1982	Studium der Molekularbiologie an der Universität Zürich
1982-1985	angestellt am Institut für Immunologie der Universität München, Arbeit an Dissertation

